

MARIANNA BOIA FERREIRA

AVALIAÇÃO DO PAPEL DA PROTEÍNA TCTP EM MELANOMA MURINO
(B16-F1 E B16-F10)

CURITIBA

2014

MARIANNA BOIA FERREIRA

AVALIAÇÃO DO PAPEL DA PROTEÍNA TCTP EM MELANOMA MURINO
(B16-F1 E B16-F10)

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e
Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor
de Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná, como parte das exigências para obtenção
de título de Mestre em Biologia Celular e
Molecular

Orientadora: Prof^a. Dra. Andrea Senff Ribeiro
Co-orientador: Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga

CURITIBA

2014

Boia-Ferreira, M.

Avaliação do Papel da Proteína TCTP em Melanoma Murino B16-F1 e B16-F10 – Curitiba, 2014. 88 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.


1. TCTP 2. Melanoma 3. B16-F1 4. B16-F10 5. Câncer

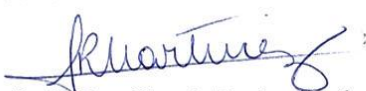
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR


Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas/ Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Profa. Dra. Andrea Senff Ribeiro
Orientadora e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Profa. Dra. Glaucia Regina Martinez
Universidade Federal do Paraná - UFPR



Prof. Dr. Rubens Bertazzoli Filho
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Suplente:

Prof. Dr. Silvio Marques Zanata
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após arguir a mestranda **Marianna Boia Ferreira**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Avaliação do papel da proteína TCTP no melanoma murino (B16-F1 e B16-F10)", são de parecer favorável à Aprovação da acadêmica, habilitando-a ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Biologia Celular e Molecular. A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 27 de Fevereiro de 2014


Prof. Dr. Edvaldo de Souza Trindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 165795

À minha mãe, pelo seu amor incondicional. Por seu apoio e compreensão. Você é um exemplo de dedicação e perseverança.

Agradecimentos

À Deus por guiar os meus caminhos e por toda proteção. Sem ele nada seria possível.

À minha mãe por toda dedicação na criação de seus filhos. Por estar sempre disposta a me ajudar e me ouvir. Obrigada por me receber de braços abertos sempre, por seu amor incondicional, por me entender e me ajudar mesmo quando eu estou errada. Agradeço por todos ensinamentos, pela educação, pelos princípios, pelo apoio e pela cumplicidade. Não tenho palavras pra expressar o quanto me orgulho em ser sua filha. Você é a luz dos meus olhos, te amo demais.

Ao meu irmão Alexandre por estar sempre ao meu lado. Obrigada por todo o seu apoio nesses dois anos, nunca esquecerei o que você fez e faz por mim. Espero um dia poder retribuir. Você é meu orgulho! Obrigada por se interessar pelos meus assuntos, por dividir a cama comigo nos momentos tristes, por me proteger, por me ouvir, pelas risadas, pelas brigas, por existir. Amo você mais que tudo.

Aos meus avós, Wilson da Silva Boia e Ana da Silva Boia obrigada por todo apoio e exemplo. Cada dia de estudo é reflexo da educação e do exemplo dados pelo meu avô. Sinto muito sua falta, agradeço por toda proteção e amor. Sei que de algum lugar você ainda guia meus caminhos. A minha avó por todo amor, paciência e carinho, meu exemplo de força e coragem.

Às minhas mães Zeloí Vieira dos Santos (Zeli) e Regina do Rocio Pereira (Re) por todo apoio e amor. Zeli obrigada por cuidar de mim desde que eu era pequenininha, pela educação, pelo estímulo, pelo ombro amigo, por estar sempre do meu lado. À Re, minha madrinha, por todo seu amor, estímulo e carinho, pelos momentos alegres, por sempre estar disposta a me ajudar, por cuidar de todos aqui, pelos momentos em família. Amo muito vocês, não teria chegado aqui sem ajuda de vocês.

À minha orientadora Dra Andrea Senff Ribeiro por todo apoio, pelos ensinamentos e pela confiança. Obrigada por me dar a oportunidade de realizar esse projeto inovador em nosso laboratório. Obrigada por acreditar em mim quando nem eu mesma acreditava, por estar sempre disposta a conversar, por priorizar a minha formação e pela amizade. Você é um exemplo de dedicação à ciência e a família.

Ao meu co-orientador e professor Dr. Silvio Sanches Veiga, por abrir as portas do seu laboratório a mim e por confiar no meu trabalho. Obrigada pelas discussões científicas, pelos ensinamentos de vida, pelas ideias e pela amizade. Muito obrigada por pensar na formação dos seus alunos, e por toda a dedicação em manter a qualidade do laboratório. Você é um exemplo de dedicação à ciência.

À Dra. Olga Meiri Chaim pelo exemplo de dedicação ao trabalho e à ciência. Pelas discussões científicas, por sempre estar disposta a me ouvir, pelo apoio durante a realização desse trabalho. Obrigada pelo apoio emocional e financeiro para a minha formação. Por sentar, me acalmar e me ajudar a começar tudo novamente quando foi necessário. Agradeço pela amizade e cumplicidade, sem a sua ajuda esse trabalho não seria possível. Você é um exemplo de amor à ciência e à família.

À Dra Luiza Helena Gremski por todos os ensinamentos, pelo apoio na realização desse trabalho, por suas correções e pela disposição em ajudar todos os alunos. Você fez grande parte desse trabalho e da minha formação. Obrigada pela amizade e carinho.

Ao Msc. Youssef Bacila Sade por todos os ensinamentos, pela paciência e por toda ajuda. Pelas discussões científicas, por me transmitir seu amor à ciência e me guiar no caminho científico. Obrigada por todas as ideias e sugestões que possibilitaram a realização desse trabalho. Agradeço por me fazer querer aprender sempre mais e por sempre esperar mais de mim, com certeza isso fez diferença na minha formação. Afinal nem só de sorte a ciência é feita,

precisa de muita competência. Obrigada pela amizade e pelos momentos de descontração.

À Dra Dilza Trevisan Silva (Amore) por tudo. Pelas discussões científicas, pelas ideias, pela ajuda na realização desse trabalho, por me acalmar sempre. Obrigada pela amizade e carinho, sem dúvidas não teria conseguido sem você. Por me deixar fazer parte da sua vida e da sua família, pelas quintas dos amigos, pelas viagens, pelas caminhadas no botânico, pela companhia na academia, pelas corridas, pelas festas, por nossas jantas deliciosas, pelos churrascos (principalmente aquele no meio da tarde), pelas caronas. Faço minha as suas palavras, você a amiga para todas as horas. Você é meu exemplo de dedicação à ciência e a família.

À Aline Viana Bednaski (Pequena) por toda sua ajuda profissional e pessoal. Por estar sempre disposta a me ouvir e ajudar. Você é amiga para todas as horas. Obrigada pela ajuda na realização dos experimentos, na montagem das imagens, na preparação de currículo. Por sua amizade, por estar sempre do meu lado mesmo quando eu não estava certa, pelo ombro amigo que tanto utilizei nesse período. Obrigada pela companhia, pelos almoços, jantas, saídas, viagens, pela parceria no milho e na batata, pelas corridas, pela companhia na academia. Agradeço todos os dias por fazer parte da minha vida e possibilitar que eu fizesse parte da sua e de sua família.

Ao Fernando Matsubara meu querido amigo e colega. Obrigada pela ajuda na realização desse trabalho, nas discussões científicas, na realização dos experimentos. Pela companhia e pela paciência, por estar sempre disposto a me ajudar e ouvir. Pelos conselhos, pelo ombro amigo, pelo carinho, pelas risadas, pelas músicas e filmes trocados, pelas comilanças, pelas fotografias. Você é um exemplo de seriedade e profissionalismo.

Aos colegas do LME Daniele Chaves, Gabriel Otto Meissner, Valéria Ferrer Pereira, Adriano Morgon, Larissa Vuitika, Matheus Regis Belisario Ferrari, Daniele Buch, Ana Carolina Martins Wille, Fernanda Nunes Souza, Soraya Fialek, Marta Oliverio, Eduardo Soares, Mariana Magnoni, Eduardo Mendonça,

Brenda Marin, João Stanke, Bruna Lui, Hanna Camara da Justa, Verônica Cubas, Kiane Freitas obrigada por estarem sempre dispostos a ajudar. Agradeço pela amizade e carinho, pelos momentos de descontração, pelos cafés, almoços, coletas, corridas de kart, pelas risadas. Obrigada por me aguentarem e me acalmarem sempre. Só tenho a agradecer a oportunidade pessoal e profissional de conviver com cada um de vocês.

Em especial a Alessandra Emy Hamasaki (Ale) e Thiago Lopes de Mari (Thi) pelos 7 anos de amizade, companheirismo e carinho. Thi obrigada por ajudar a abrir as portas do laboratório para mim, por sempre me acalmar e escutar. À Ale minha dívida e agradecimento a você são maiores do que qualquer palavra que eu possa escrever aqui. Obrigada por fazer parte da minha vida, por tratar meus problemas como se fossem seus, por me escutar, pelas risadas, viagens, festas, pelas comilanças, por ser mais que uma amiga, por ser uma irmã. Obrigada por toda confiança e toda ajuda na realização desse trabalho. Só tenho a agradecer por vocês me deixarem fazer parte de suas vidas e de suas famílias.

Em especial ao meu início científico Lucas Pedrosa. Agradeço por tornar os meus dias mais alegres, por toda ajuda na execução dos experimentos (pelos milhares de western blots e cultivos celulares principalmente). Obrigada pelas risadas, pelas conversas, por sempre estar disposto a me ajudar e me ouvir. Por aturar meu mau humor e esse meu jeitinho delicado. Sinto não ter sido uma orientadora melhor, mas com certeza não me esquecerei dessa experiência. Obrigada pela amizade e carinho. Você é meu orgulho. Desejo toda sorte do mundo nesse seu novo caminho.

Aos colegas do laboratório de Neurobiologia pela disponibilidade em ajudar sempre. Em especial a Márcia Helena Appel, Beatriz Borges (Bia) e Valentin Coppola. À Márcia pelo auxílio na execução desses experimentos, por estar sempre disposta a me ajudar e ouvir, obrigada pela amizade e carinho. Você é um exemplo de persistência e amor à ciência. À Bia por toda ajuda na cultura, pelas dicas e discussões científicas, por me ajudar em todos os momentos que

precisei, agradeço a amizade e o carinho. Ao Valentín pelas discussões científicas e o auxílio na execução desse trabalho.

À Chellin Auswaldt Steclan (Che) obrigada por fazer parte da minha vida. Agradeço todas as discussões científicas e ajuda na execução dos experimentos. Obrigada pela amizade e carinho, pelas quintas dos amigos, pelas festas, congressos, por sempre estar disposta a me ouvir, pelo ombro amigo, pela confiança e cumplicidade. Você faz muita falta no meu dia a dia.

Às minhas queridas Gabriela Sbeghen, Beatriz Gertz, Bianca Bortoluzzi Correa, Adriane Follador, Priscila Santos, Rayana Kaminski, Manu Lima pela amizade, carinho e apoio. Obrigada pela confiança, pelas risadas e pelos momentos de descontração. Amo todas vocês.

Ao meu querido Manoel Silva (Guarujá) pela amizade de tantos anos. Pela companhia as missas e novenas, pelos momentos de descontração, pelo carinho e apoio. Muito obrigada meu irmão.

Ao Leandro Homann pelo apoio em muitos momentos da minha formação, sempre com alegria e palavras de carinho e estímulo. À Sabrina Homann por sua amizade e carinho e principalmente por me dar o Vinícius Homann, meu afilhado, meu amor maior, aquele que renova minhas energias, que me faz sorrir quando eu achava que seria impossível. Ao Fernando Homann e à Cleuza Homann por todo apoio e carinho.

Ao prof. Dr Silvio Marques Zanata e prof Dr. Rubens Bertazolli Filho pelas correções dos relatórios e por todos os comentários e discussões pertinentes. E principalmente por aceitarem fazer parte da banca desse trabalho.

A prof^a Dra Glaucia Regina Martinez por aceitar fazer parte da banca desse trabalho.

Ao Sr. Luiz e Sr. Sebastião (Tião) pelo ser cordial bom dia/ boa tarde. Pelo divertido relato do cardápio do RU. Por sempre estarem dispostos a nos ajudar e por sua preocupação com todos nós.

Ao coordenador do programa Edvaldo, vice-coordenador Marco e secretária do programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular Marlene.

À CAPES, Fundação Araucária, FAPESP, SETI, CNPq e familiares pelo apoio financeiro.

À todos que de alguma forma contribuíram para o meu trabalho.

“Se quer saber, nunca é tarde demais para ser quem você quiser ser; não há limite de tempo, comece quando você quiser. Você pode mudar ou ficar como está, não há regras para esse tipo de coisa. Podemos encarar a vida de forma positiva ou negativa, espero que encare de forma positiva; espero que veja coisas que surpreendam você; espero que sinta coisas que nunca sentiu antes; espero que conheça pessoas com ponto de vista diferente; espero que tenha uma vida da qual você se orgulhe. E se você descobrir que não tem, espero que tenha forças para conseguir começar de novo.”

F. Scott Fitzgerald

RESUMO

O tumor do tipo melanoma da pele apresenta baixa incidência contudo, sua letalidade é extremamente elevada. As linhagens B16 constituem um modelo de melanoma murino muito útil na oncologia experimental. A linhagem B16F10 apresenta alta capacidade de invasão e metastização enquanto que a linhagem B16-F1 apresenta menor motilidade *in vitro* e, portanto, baixo potencial metastático. A TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*) é expressa em diversos organismos e tecidos, o que aponta um papel biológico fundamental. Diferentes estudos já estabeleceram seu envolvimento na regulação do ciclo e proliferação celular, bem como na malignidade e como fator protetor contra estresse e apoptose. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o papel da TCTP em melanoma murino (B16F1 e B16F10). O perfil proteico bidimensional apresentado pelas linhagens foi diferente: a linhagem B16-F10 apresentou 201 *spots* e a linhagem B16-F1 126 *spots*. Essa diferença pode estar relacionada à complexidade celular da B16-F10, mais maligna e metastática. Em ambos os extratos foi identificada uma proteína com mobilidade eletroforética de 20 kDa e pI de 4,8 (valores esperados para TCTP). Além disso, a TCTP foi imunodetectada por western blotting. A linhagem B16-F1 apresentou um menor sinal de detecção quando comparada à B16-F10., Essa diferença poderia estar associada a uma maior expressão de TCTP em células tumorais mais metastáticas e invasivas e, conseqüentemente, a B16F10 apresentaria níveis superiores de TCTP. Esta hipótese foi confirmada por PCR em tempo real: B16-F10 apresentou níveis de RNAm para TCTP superiores aos encontrados para B16-F1. Esses dados corroboram com os resultados do western blotting e com dados da literatura que relacionam a TCTP à linhagens malignas, devido ao seu papel anti-apoptótico e seu antagonismo com a p53. A fim de avaliar o papel biológico da TCTP no melanoma, esta foi silenciada na linhagem B16-F10, utilizando a técnica de RNAi. O silenciamento diminuiu os níveis de TCTP em 50 a 70% quando utilizado 50 nM e 60 a 80% quando utilizado 100 nM do duplex após 24, 48 e 72 horas de transfecção. As linhagens transfectadas com RNAi para TCTP apresentaram menor proliferação, menor migração e maior adesão celular às moléculas da matriz extracelular quando comparadas às linhagens transfectadas com o controle negativo. Porém, não houve qualquer alteração significativa da viabilidade celular. O aumento da proliferação celular e do potencial migratório são dois eventos muito importantes para a tumorigênese, e estão intimamente relacionados à malignidade. Portanto, o silenciamento foi capaz de regredir o fenótipo de malignidade da linhagem B16-F10, deixando esse mais próximo da B16-F1. Dessa forma, nosso estudo caracterizou os perfis celulares das duas linhagens e demonstrou uma diferença no número de proteínas e parceiros moleculares entre ambas linhagens. Além disso, nossos dados sugerem que o silenciamento da TCTP tornou a linhagem B16-F10 menos metastática e maligna, com um fenótipo mais próximo ao de uma célula normal. Mais estudos são necessários com o intuito de identificar possíveis parceiros e melhor entender o papel dessa proteína multifuncional no melanoma murino.

Palavras-chave: TCTP, melanoma, B16-10, B16-F1, câncer

ABSTRACT

Skin melanoma tumor displays low incidence, however, its lethality is extremely high. B16 cell lines typify a murine melanoma model very useful on the experimental oncology field. B16-F10 cell line exhibits high invasion and metastization capacities while B16-F1 cell line depicts lower *in vitro* motility and, therefore, low metastasis potential. TCTP (translationally controlled tumor protein) is expressed in several organisms and tissues, which suggests a fundamental biological role. Different studies have already settled its participation in cell cycle regulation and cell proliferation, as well as in malignancy and as a protective factor against stress and apoptosis. Thus, this study aimed to assess the TCTP role in murine melanoma (B16-F1 and B16-F10). Two-dimensional electrophoresis profiles of proteins from the two cell lines were different: B16-F10 cells presented 201 electrophoresis *spots* while B16-F1 originated 126 *spots*. This difference may be related to the B16-F10 cell complexity, since this cell line is more malignant and metastatic. In both cell extracts was identified a protein with electrophoretic mobility about 20 kDa and deduced pI of 4.8 (expected parameters for TCTP). Furthermore, TCTP was immunodetected by western blotting analysis. B16-F1 cells produced low detection signals when compared to the B16-F10 cells. This difference may be associated to the higher TCTP expression in more metastatic and invasive tumoral cells and, consequently, B16-F10 would present higher TCTP levels. This hypothesis was confirmed by Real-Time PCR, since B16-F10 revealed RNAm levels for TCTP higher than the B16-F1. These data corroborate with western blotting results and the specific literature, which connect TCTP and malignant cell lines due to the anti-apoptotic function and its p53 antagonism. In order to evaluate the biological role of TCTP in melanoma, it was performed the TCTP silencing in B16-F10 cell line by using RNA interference (RNAi) method. The gene silencing reduced TCTP levels in 50% to 70% when used 50 nM and 60% to 80% when used 100 nm of the duplex after 24, 48 and 72 hours of transfection. The transfected cell lines with RNAi for TCTP presented lower proliferation, lower migration and higher cell adhesion to extracellular matrix molecules when compared to the cell lines transfected with negative control. However, there was no significant change in cell viability. Increasing cell proliferation and migration potential are two events very important for the tumorigenesis process and they are closely related to the malignancy. Therefore, gene silencing was able to recede the malignant phenotype of B16-F10 cell line, resulting in a similar aspect to the B16-F1 cells. Thus, this study characterized the profile of two cell lines and it demonstrated differences in protein number and molecular partners between these two cell lines. Moreover, the generated data suggest that TCTP gene silencing became B16-F10 cells less metastatic and malignant, resembling the normal cell phenotype. Further studies are necessary in order to identify possible partners and to better understand the TCTP role in the murine melanoma.

Key-words: TCTP, melanoma, B16-10, B16-F1, cancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- Alterações moleculares propostas associadas à iniciação e progressão do melanoma.

FIGURA 2- TCTP é uma proteína multifuncional.

FIGURA 3- Estrutura tridimensional da proteína
TCTP

FIGURA 4- Perfil proteico bidimenssional dos extratos celulares de B16-F1 e B16-F10.

FIGURA 5- Imunoreação do extrato celular de B16-F1 com anticorpos que reconhecem LiRecTCTP.

FIGURA 6- Imunoreação do extrato celular de B16-F10 com anticorpos que reconhecem LiRecTCTP

FIGURA 7- Avaliação da qualidade do RNA após extração pelo método de Trizol
FIGURA 8- Avaliação dos transcritos (TCTP e GAPDH) em PCR.

FIGURA 9- Avaliação dos primers para PCR em Tempo Real em PCR

FIGURA 10- Porcentagem da expressão relativa de TCTP

FIGURA 11- Avaliação do Potencial de Transfecção da linhagem B16-F10.

FIGURA 12- Porcentagem da expressão relativa de TCTP após transfecção com 50 nM de siRNA para TCTP e controle negativo

FIGURA 13- Porcentagem da expressão relativa de TCTP após transfecção de 100 nM de siRNA para TCTP e controle negativo.

FIGURA 14- Avaliação da Proliferação Celular com Cristal Violeta

FIGURA 15- Viabilidade Celular após interferência por RNA

FIGURA 16- Comparação do perfil de migração da linhagem B16-F1 e B16-

F10
FIGURA 17- Efeito do RNAi para TCTP na migração celular por transwell.

FIGURA 18- Adesão das células não transfectadas e transfectadas com RNAi para TCTP e controle negativo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Objetivo Geral.....	19
1.2 Objetivos Específicos	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Câncer	20
2.2 Melanoma.....	21
2.2.1 Melanoma Murino.....	23
2.3 TCTP	24
2.3.1 Estrutura molecular e conservação	25
2.3.2 O gene da proteína TCTP (TPT1) e seus RNAs	27
2.3.3 Regulação do ciclo celular	28
2.3.4 Atividade anti-apoptótica	29
2.3.5 Relação entre TCTP e P53	29
2.3.6 Interação com proteína G	30
2.3.7 Expressão de TCTP em tumores humanos	31
2.3.8 TCTP no modelo de reversão tumoral e como alvo para drogas anti-câncer	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 Reagentes	34
3.2 Cultivo Celular	34
3.3 Preparo de Extratos Proteicos Celulares	35
3.4 Dosagem de Proteínas pelo Método MicroBCA	35
3.5 Eletroforese Bidimensional	35
3.6 Immunoblotting Bidimensional.....	36
3.7 Extração de RNA	37

3.8 RT-PCR.....	37
3.9 PCR.....	38
3.10 Eletroforese de DNA em Gel de Agarose	38
3.11 PCR em Tempo Real	38
3.12 Teste de Transfecção.....	39
3.13 Silenciamento por RNA de Interferência	39
3.14 Proliferação Celular.....	40
3.15 Viabilidade Celular	40
3.16 Migração Celular por Scratch.....	40
3.17 Migração Celular por Transwell	41
3.18 Ensaio de Adesão	41
3.19 Análise Estatística.....	42
4. RESULTADOS.....	43
5 DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	72
REFERENCIAS.....	73
ANEXOS	84

1. INTRODUÇÃO

O melanoma é um tipo de câncer cutâneo derivado de melanócitos (células produtoras de melanina). O desenvolvimento do melanoma não está totalmente esclarecido e tem sido associado à suscetibilidade genética e fatores ambientais predisponentes como a destruição da camada de ozônio e/ou alta exposição aos raios ultravioletas, principalmente UVB (TUCKER; GOLDSTAIN, 2003; MORTON *et al.*, 2003). A incidência do câncer de pele não melanoma é prevalente em indivíduos adultos de cor branca e é responsável por 25% dos casos de câncer no Brasil. Essa neoplasia maligna possui mau prognóstico em estados avançados além de ser reconhecida como um dos cânceres mais agressivos por apresentar alta propensão às metástases e por ser refratária ao tratamento com quimioterápicos (SALEEN, 2008). A crescente incidência do melanoma, seu alto grau de malignidade e a ausência de uma terapia eficaz tem motivado a comunidade científica a buscar modelos adequados para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

O uso de modelos murinos de melanoma já é bem estabelecido. As linhagens de células de melanoma murino da série B16 são modelos bem caracterizados para análise da progressão tumoral e avaliação de agentes anticancerígenos (DUNCAN, 1998). Embora seja difícil extrapolar diretamente os resultados obtidos com essas linhagens para seres humanos, esses modelos animais são importantes ferramentas experimentais, pois possibilitam o estudo de novas drogas e novas estratégias terapêuticas.

O sequenciamento do genoma humano permitiu e permitirá a descoberta e caracterização de genes críticos no desenvolvimento e manutenção do câncer. A identificação de genes e vias envolvidas nessa progressão aumentará o entendimento biológico desse processo e ainda poderá identificar novos alvos para diagnóstico precoce e tratamento da doença. Muitos estudos em biologia celular e molecular têm o intuito de compreender os genes e mecanismos que levam a formação dos cânceres. Além disso, perfis de expressão gênica estão sendo utilizados para a subclassificação de alguns tipos de tumores e para fins prognósticos (GARNIS, 2004; MCKENZIE; GROSSMAN, 2012).

Dentre os genes de interesse relacionados à progressão do ciclo celular e a malignidade celular está o gene da proteína TCTP, do inglês Translationally Controlled Tumor Protein. A proteína TCTP, inicialmente denominada P21, q23, p23, fortilina e HRF (do inglês Histamine Releasing Factor) vêm despertando muito interesse da comunidade científica. A TCTP apresenta diversas propriedades biológicas e seu papel ainda não é bem entendido (GACHET *et al.*, 1999; BOMMER; THIELE, 2004; TELERMAN; AMSON, 2009; BOMMER, 2012). Recentemente, o que impressiona é a variedade de atividades celulares e extracelulares descritas para TCTP, a qual tem sido referida como uma proteína multi-funcional (AMSON *et al.*, 2012).

A proteína TCTP é essencial para o desenvolvimento embrionário e proliferação celular em camundongos e em *Drosophila*. Além disso, ela possui a capacidade de ligar cálcio e estabilizar microtúbulos, podendo então estar relacionada ao controle do ciclo celular (BOMMER; THIELE, 2004; HINOJOSA-MOYA *et al.*, 2008). Estudos têm identificado proteínas que interagem com a TCTP e mostrado que estão relacionadas a diversas vias bioquímicas e de sinalização. Por exemplo, as interações entre a TCTP e a tubulina (GACHET *et al.*, 1999, RINNERTHALER *et al.*, 2006), actina-F (BAZILE *et al.*, 2009), o PLK em mamíferos (YARM, 2002), fatores de tradução e alongamento eEF1A e eEF1Bbeta (CANS *et al.*, 2003), Mcl-1 (LIU *et al.* 2005, LI *et al.*, 2001), TSAP6 (AMZALLAG *et al.*, 2004), Na, K-ATPase (JUNG *et al.*, 2004), Bcl-XL (YANG *et al.*, 2005) e Chrf (BURGESS *et al.*, 2008). Recentemente, uma revisão resumizou as proteínas com as quais a TCTP interage, são dezenas de proteínas envolvidas com citoesqueleto e maquinaria mitótica, processamento e reparo de DNA, biossíntese de proteínas, via da p53, entre outros processos celulares vitais (AMSON *et al.*, 2012).

Diferentes estudos já estabeleceram o envolvimento da TCTP na regulação e proliferação do ciclo celular, na malignidade e na proteção das células contra condições de estresse e apoptose (BOMMER; THIELE, 2004, CHEN *et al.* 2007, SUSINI *et al.*, 2008, TELERMAN; AMSON, 2009; AMSON *et al.*, 2012). Níveis de TCTP aumentados foram demonstrados em diferentes células tumorais e tumores humanos (TELERMAN; AMSON, 2009, SLABY *et al.*, 2009, MA *et al.*, 2010), bem como em células de melanoma murinho B16-F10 (SADE *et al.*, 2012). Além disso, a regulação negativa (*dowregulation*) da TCTP tem sido utilizada com sucesso em modelos biológicos de reversão

tumoral (TUYNDER *et al.*, 2002; TUYNDER *et al.*, 2004). A redução dos níveis de TCTP é responsável pela reprogramação de células tumorais em células denominadas “revertentes”, as quais não apresentam mais o fenótipo maligno. A reversão tumoral pela diminuição dos níveis intracelulares de TCTP foi observada em células de melanoma (WM-266-4, WM-115, SK-MEL-28 e Hs852T (TUYNDER *et al.*, 2004). Portanto, a TCTP se mostra como um possível biomarcador tumoral com aplicação em testes diagnósticos (VAN DE SANDE *et al.*, 2006, SLABY *et al.*, 2009, KIM *et al.*, 2008) e possível alvo terapêutico (ZHU *et al.*, 2008). A TCTP mostrou ser um regulador chave da estabilidade e atividade de p53, e estas duas proteínas apresentam repressão recíproca (AMSON *et al.*, 2012). Em modelos tumorais, estudos com drogas que inibem a atividade da TCTP mostraram diminuição do crescimento tumoral *in vitro* e *in vivo* (TUYNDER *et al.*, 2004). Ainda, algumas drogas que atuam sobre a TCTP estão em triagem clínica (TELERMAN; AMSON, 2009; AMSON *et al.*, 2012).

Dessa forma esse projeto tem o intuito de elucidar a participação da TCTP na malignidade do melanoma em modelos celulares, trazendo novas informações sobre a participação desta proteína nesses processos, assim como um melhor entendimento dos mecanismos relacionados à tumorigênese.

1.1 Objetivo Geral

- Avaliar o papel da proteína TCTP na malignidade de células de melanoma murino.

1.2 Objetivos Específicos

- Identificar a presença da proteína TCTP na linhagem celular de melanoma murino B16-F1;
- Comparar a expressão da proteína TCTP entre as linhagens de melanoma murino B16-F1 e B16-F10;
- Silenciar o gene da TCTP na linhagem mais metastática B16-F10 e comparar o perfil celular com a linhagem não silenciada B16-F10 e com a B16-F1, menos metastática.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer

A progressiva ascensão da incidência e da mortalidade por doenças crônico-degenerativas tem como principal fator o envelhecimento da população, resultante do intenso processo de urbanização e de ações de promoção e recuperação da saúde. No Brasil, as estimativas para os anos de 2012 e 2013 apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 novos casos de câncer, sendo destes aproximadamente 25.7% referentes aos casos de câncer de pele do tipo não melanoma. Os tipos mais incidentes de câncer serão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon, reto e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo de útero, cólon, reto e glândula tireoide para o sexo feminino (Instituto Nacional do Câncer-INCA).

O tumor do tipo melanoma da pele apresenta baixa incidência (3.170 casos novos em homens e 3.060 casos novos em mulheres em 2012), contudo, a letalidade é extremamente elevada. No Brasil, as maiores taxas são estimadas na região sul. Esse tipo de câncer acomete principalmente os caucasianos que moram em países com alta intensidade de radiação ultravioleta. No entanto, os melanomas podem afetar todos os grupos étnicos em alguma proporção. Se detectados em estágios iniciais, os melanomas são curáveis e seu prognóstico é considerado bom. Contudo, quando o melanoma é detectado em um estado avançado, o prognóstico pode variar de 3 a 6 meses de vida (Instituto Nacional do Câncer-INCA, MCKENZIE; GROSSMAN, 2012).

Os tumores originam-se a partir de uma única célula que sofre uma mutação, a qual é transmitida as células descendentes. Estas, ao sofrerem ou acumularem novas mutações, de sequência ou epigenéticas que lhes conferem alguma vantagem seletiva, passam por uma seleção natural e tornam-se cancerosas. As células tumorais multiplicam-se rapidamente e são capazes de escapar do mecanismo celular de morte programada (apoptose), da senescência celular replicativa e das vias de diferenciação que normalmente bloqueariam sua capacidade de crescimento e divisão. Além disso, os tumores são mais do que massas insulares de proliferação de células cancerosas. Eles

são tecidos complexos constituídos por tipos celulares diferentes que participam de interações heterotípicas. Os marcadores de malignidade do câncer compreendem propriedades biológicas adquiridas durante o desenvolvimento das várias etapas da tumorigênese, essas incluem manutenção da sinalização proliferativa, capacidade de escapar dos supressores de crescimento, resistência à morte celular, imortabilidade replicativa, angiogênese, invasão e metástase. O câncer progride devido a alterações genéticas, e consequentemente, mudanças no padrão de expressão gênica. Mutações com perda de funções em genes supressores tumorais e com ganho de função em oncogenes podem liberar a célula da inibição normal de crescimento e divisão celular, assim como estimular um crescimento anormal. Esse é o princípio mais aceito atualmente em relação ao processo de origem e progressão tumoral, que envolve o desenvolvimento inicial de células com potencial tumorigênico dentro do sítio primário de formação do tumor. (MCKENZIE; GROSSMAN, 2012, WICHA; LIU; DONTU, 2006; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O câncer era anteriormente visto como uma massa homogênea de células que proliferavam rapidamente, e as terapias eram designadas para eliminar essas células com alto potencial proliferativo. Porém, estudos recentes tem sugerido que essas células tumorais são heterogêneas em relação à proliferação e diferenciação, e que a taxa de proliferação pode ser um indicador do potencial tumorigênico. Em alguns tipos de tumores, a capacidade de iniciar e manter o crescimento foi encontrada em uma pequena população de células chamadas células-tronco tumorais (REYA *et al.*, 2001; MCKENZIE; GROSSMAN, 2012. WICHA; LIU; DONTU, 2006).

2.2 Melanoma

O melanoma foi descrito pela primeira vez por Hipócrates no século V, sendo o termo melanoma empregado apenas em 1938 por Carswell (DAVIS, 1985). Acredita-se que vários fatores contribuam para o surgimento do melanoma como: predisposição genética, traumatismos repetitivos em nevos preexistentes, alterações hormonais, viroses, deficiência imunológica e particularmente exposição à luz solar. Aparentemente a exposição à radiação ultravioleta de forma intensa e intermitente, sem tempo para produção de

melanina para sua proteção, pode gerar lesões no DNA e mutações, envolvendo principalmente o gene supressor de tumor PTEN/MMAC1, sendo a perda da heterozigose detectada em mais de 40% dos melanomas (ADAN; EFRON, 1983; DICK *et al.*, 1988; GREEN, 1984; PERLIS; HERLYN, 2004; SAIDA, 2001).

A hierarquia das células-tronco tumorais foi sugerida para o melanoma, nas quais células primitivas auto-renováveis capazes de iniciar a tumorigênese originam células altamente proliferativas e mais diferenciadas que constituem o centro da massa tumoral (SUSAN; HERLYN, 2008). Células *stem-like* foram propagadas, tanto em células de melanoma em cultivo quanto em isolados clínicos de tumores de pacientes, como células esféricas não aderentes capazes de auto-renovação, diferenciação em várias linhagens mesenquimais e iniciação de tumores em modelos de xenotransplante com um pequeno número de células. (FANG *et al.*, 2005).

O modelo clássico de progressão do melanoma humano, assim como ocorre em alguns modelos de camundongos, ocorre a partir de um nevo benigno. Este é formado por uma população de melanócitos que proliferam de maneira organizada e forma uma lesão hiperplásica, geralmente em resposta a radiação UV, que não progride devido à senescência celular (MOOI; PEEPER, 2006; GRAY SCHOPFER *et al.*, 2006). Uma vez vencida essa barreira proliferativa, esse nevo torna-se displásico e podem progredir para um estado de espalhamento superficial, chamada Fase de Crescimento Radial (RGP), que é confinado a epiderme e possui baixo potencial invasivo. Posteriormente, essas células RPG podem adquirir a capacidade de invadir a derme rompendo a membrana basal, etapa chamada de Fase de Crescimento Vertical (VGP). Dados clínicos sugerem que nem todos os melanomas surgem dessa forma, pois já foram observados casos de doença metastática sem evidente lesão primária (MILLER; MIHM, 2006). Na figura 1 podemos observar um desenho esquemático proposto para progressão do melanoma (ZAID *et al.*, 2008).

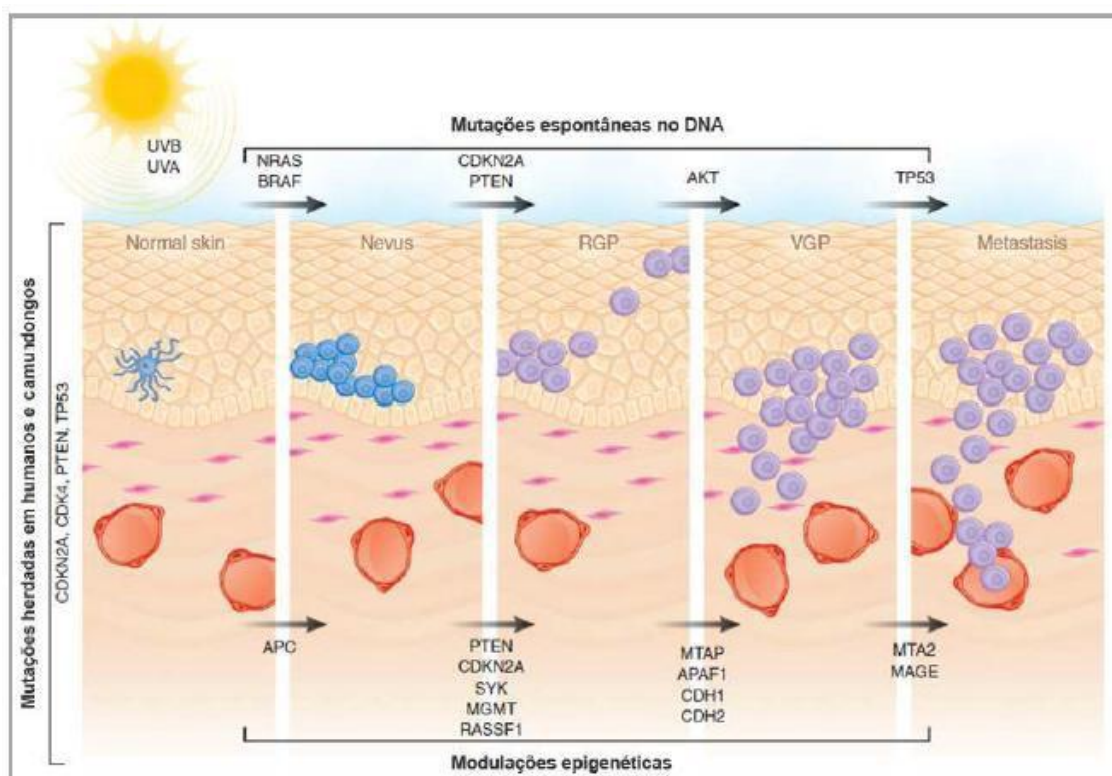


FIGURA 1: Alterações moleculares propostas associadas à iniciação e progressão do melanoma. Desenho esquemático da progressão do melanoma humano, semelhante em modelos de camundongos e alterações moleculares que podem ocorrer em diferentes fases. Proliferação aberrante de melanócitos normais, possivelmente em resposta à radiação UV, resultando na formação de nevos benignos ou displásicos. Fase de crescimento radial do melanoma (RGP) apresenta capacidade de crescimento intraepidermal, seguida de invasão da derme na fase de crescimento vertical (VGP) culminando em metástase. Adaptado de ZAID *et al.*, 2008.

Alguns genes de susceptibilidade ao melanoma já foram descritos em pacientes afetados pela doença e validados em modelos animais. Dentre eles estão às mutações herdadas nos genes CDKN2A (HOCKER; TSAO, 2007) e CDK4 (SOTILLO *et al.*, 2001), as mutações espontâneas em BRAF (DAVIES *et al.*, 2002; HOCKER; TSAO, 2007), NRAS (HOCKER; TSAO, 2007) e TP53 (HUSSEIN *et al.*, 2003). O melanoma também pode ser resultado da modulação epigenética da expressão gênica, sendo muitos genes desregulados por metilação do DNA, assim como por modificações em histonas (MUTHUSAMY *et al.*, 2006; ROTHHAMMER; BOSSERHOF, 2007).

2.2.1 Melanoma Murino

O melanoma da série B16 foi obtido a partir de um melanoma que se desenvolveu espontaneamente em camundongos C57BL/6. A linhagem B16, proveniente do tumor, foi mantida em cultura e *in vivo*, pelo transplante

subcutâneo das células do tumor de camundongos isogênicos C57BL/6, e denominada B16-F0. Diversas sublinhagens de tumor foram derivadas das células tumorais desses animais e selecionadas por suas características de implantação, invasão, sobrevivência e crescimento a fim de formar metástase em pulmão, após injeção subcutânea na mesma linhagem animal (camundongos C57BL/6). Com os tumores desenvolvidos no pulmão, que eram identificados por sua pigmentação (melanina) e retirados para adaptação de crescimento em cultura, foi obtida a linhagem designada B16-F1. As células B16-F1 eram injetadas em um novo grupo de animais isogênicos para selecionar a linhagem B16-F2. Após dez seleções, foi obtida a linhagem B16-F10, com maior capacidade de gerar metástase nos pulmões, quando comparada à linhagem B16-F1 (FIDLER, 1973; NICOLSON *et al.*, 1978; TANIGUCHI *et al.*, 1985). A linhagem B16-F0 é menos invasiva se comparada às linhagens B16-F10 e B16-BL6 (estabelecidas a partir das células B16-F10 que penetram na bexiga dos camundongos) e a habilidade de formar metástase aumenta segundo a ordem: B16-F0<B16-F1<B16-F10=B16-BL6 (ISHIGURO *et al.*, 1996; NAKAMURA *et al.*, 2002).

A linhagem B16-F10 constitui um modelo muito útil no estudo do melanoma, pois: (a) o tumor surgiu espontaneamente na linhagem murina C57BL/6 e possuem o mesmo complexo de histocompatibilidade, (b) os tumores podem ser observados facilmente pela presença de melanina e (c) as células podem ser facilmente cultivadas *in vitro* e injetadas por diferentes vias *in vivo* para realização de diferentes estratégias experimentais. Uma dificuldade em utilizar esse modelo para estudar o melanoma é o fato de que as células são aplicadas de forma subcutânea, e isso não reflete o surgimento natural do tumor na epiderme. Dessa forma alguns processos de invasão acabam sendo ignorados, mas sua capacidade de metástase pode ser avaliada e terapias para sua prevenção podem ser testadas.

A linhagem B16-F10 apresenta alta capacidade de invadir a circulação e produzir metástases. A linhagem B16-F1 apresenta uma menor motilidade *in vitro* e, portanto um baixo potencial metastático se comparada à linhagem B16-F10 (CHEN; ROTENBERG, 2010).

2.3 TCTP

A proteína TCTP, do inglês *Translationally Controlled Tumor Protein*, foi identificada há aproximadamente 30 anos, por três grupos de pesquisa diferentes que estudavam proteínas reguladas a nível traducional, recebendo três denominações distintas (P21, Q23 e P23). Essa proteína recebeu ainda

algumas denominações que enfatizam algumas de suas atividades como fortilina, relacionada com sua atividade antiapoptótica, e HRF (do inglês *histamine releasing factor*), que enfatiza a atividade extracelular da proteína. Nas últimas três décadas, diversos grupos passaram a mostrar interesse no entendimento da função biológica desta proteína, uma vez que ela possui diferentes propriedades biológicas e seu papel nos organismos não foi totalmente esclarecido (FIGURA 2) (GACHET *et al.*, 1999; BOMMER; THIELE, 2004; BOOMER, 2012).

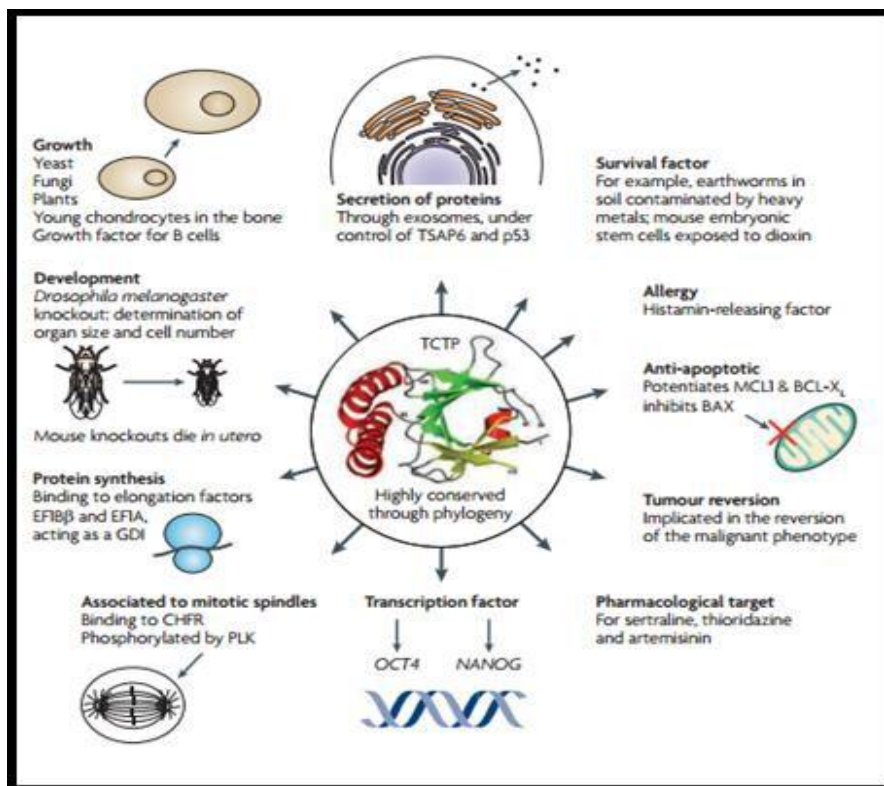


FIGURA 2: TCTP é uma proteína multifuncional. Adaptado de TELERMAN; AMSON, 2009.

2.3.1 Estrutura molecular e conservação

A clonagem e o sequenciamento da TCTP não forneceram informações quanto a sua funcionalidade, pois, não foi encontrada similaridade com outras proteínas. Assim ela foi listada e depositada nos bancos de dados como uma família. Com o posterior depósito de diversas sequências de TCTPs verificou-se que ela possui um alto grau de conservação em todo o reino animal. Aproximadamente 50% de todos seus resíduos de aminoácidos são conservados. O grau de conservação desta proteína em plantas é semelhante. As TCTPs de eucariotos possuem alto grau de identidade e são totalmente conservadas em espécies do mesmo gênero. Não existe descrição de uma proteína semelhante em bactérias, indicando que o seu surgimento ocorreu após a separação entre procariotos e eucariotos. Além disso, a análise filogenética da proteína TCTP mostra que a sua evolução reflete a história

evolutiva dos organismos eucariotos (VENUGOPAL, 2005; HINOJOSA-MOYA *et al.*, 2008; BOOMER, 2012).

A análise da estrutura secundária de TCTP de diferentes organismos mostra que em um lado do núcleo de segmentos de conformação β estão presentes os aminoácidos totalmente conservados sugerindo que esta região possa ser relevante para interações moleculares da proteína. Além disso, foram mapeados alguns domínios. O domínio de ligação aos microtúbulos, semelhante ao domínio presente na proteína MAP-1B (proteína de associação a microtúbulos). Também foi mapeado um sítio não canônico de ligação ao cálcio. Ambos os sítios estão localizados na porção α -hélice da proteína, sendo essa porção mais básica e carregada (GACHET *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2000; BOMMER; THIELE, 2004).

A sequência da TCTP é composta de duas sequências consenso, a TCTP1 ([IFAED] - [GA] - [GASF] - N - [PAK] - S - [GTA] - E - [GDEVCF] - [PAGEQV] - [DEQGAV]) localizada na região *loop* móvel que une dois segmentos da folha β C, e a assinatura TCTP2 ([FLIV] - x(4) - [FLVH] - [FY] - [MIVCT] - G - E - x(4,7) - [DENP] - [GAST] - x - [LIVM] - [GAVI] - x(3) - [FYWQ]), que contém resíduos conservados de um segmento da folha β A e da folha β D bem como do *loop* que une as duas folhas (BOMMER; THIELE, 2004).

A primeira estrutura 3D de TCTP de *Schizosaccharomyces pombe* demonstrou que a TCTP é composta por três domínios distintos: um núcleo de segmentos em conformação β , um domínio α -hélice e um *loop* flexível (FIGURA 3). Outras estruturas de TCTP foram depositadas no banco de dados, as quais confirmaram sua conservação. A análise destas estruturas por RMN revela que a proteína é composta por folhas β e α -hélices, sendo que regiões pertencentes a 3 folhas β e uma α -hélice apresentam similaridade estrutural com chaperonas Mss4, ligante de proteínas Rab. Esta proteína foi classificada como uma GFC (do inglês, *guanine nucleotide-free chaperones*), pois apresenta três resíduos de aminoácidos conservados envolvidos na ligação da proteína TCTP a proteínas G. Essa interação entre TCTP e GTPases pode ser responsável pelo controle da proliferação (THAW *et al.*, 2001; BOOMER, 2012).

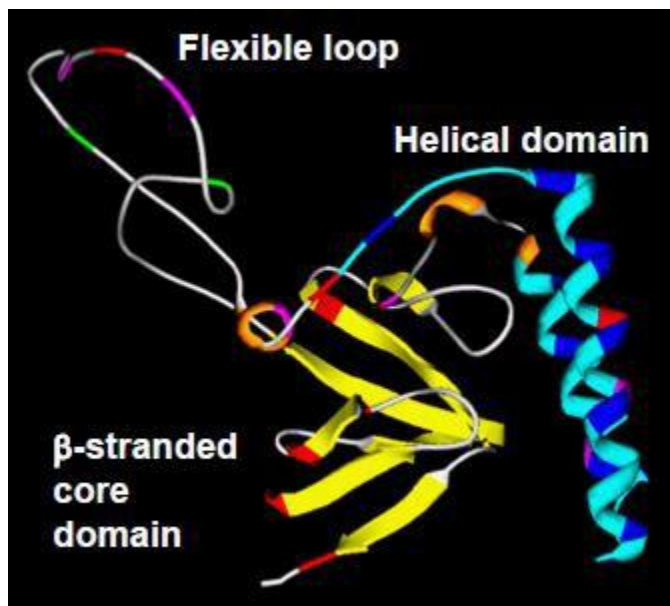


FIGURA 3: Estrutura tridimensional da proteína TCTP. O domínio folha- β está em amarelo e o domínio α -hélice em azul. Os resíduos conservados aparecem em vermelho ou rosa. Em verde temos os resíduos de serina fosforilados pela quinase mitótica Plk-1. Adaptado de BOOMER, 2012.

2.3.2 O gene da proteína TCTP (TPT1) e seus RNAs

O gene da proteína TCTP, denominado TPT1 é organizado em cinco íntrons e seis éxons, totalizando cerca de 3820 pares de base. O promotor flanqueia a região 5', distante 1200 pares de base e possui a *TATA Box* na posição -30, bem como sítio para ligação de fatores de transcrição. A transcrição do gene gera dois RNAs mensageiros de diferentes tamanhos (com diferentes regiões 3'-UTR, formadas por poliadenilação alternativa), sendo o RNAm longo mais estável e menos abundante em tecidos humanos, quando comparado ao RNAm curto. A região 5'-UTR do RNAm possui uma região rica em pirimidina (THIELE *et al.*, 1998; THIELE *et al.*, 2000). Foi demonstrado ainda que alterações nos níveis de cálcio intracelular podem estimular a transcrição do gene *tpt1* e também regular a tradução do RNAm (XU; BELLAMY; TAYLOR, 1999). Diversas outras situações já foram relacionadas com a expressão do gene *tpt1*, tais como a indução do crescimento celular, ciclo circadiano, ativação de macrófagos, resposta a diferentes tipos de estresse e indução de apoptose (BOMMER *et al.*, 2002; BOMMER, 2012).

A estrutura secundária do RNAm regula componentes celulares envolvidos na tradução desse RNA. A extensa estrutura secundária do RNAm codificador da TCTP foi relacionada com o eIF3E (fator eucariótico de iniciação da tradução), da quinase p70S6K (que fosforila a proteína ribossomal S6) e com a ativação de uma quinase dependente de RNA dupla-fita (PKR). Sendo que a ativação desta última suprime a tradução do RNAm da TCTP. Apesar dos mecanismos moleculares de regulação da tradução não serem bem

compreendidos, os trabalhos indicam que essa proteína é regulada nos níveis traducional e transcricional (BOMMER *et al.*, 2002; BOMMER; THIELE, 2004).

O gene da proteína TCTP em mamíferos é transcrito em dois diferentes RNAs, que aparecem em proporções e tecidos diferentes. Esse fato pode explicar a possibilidade da TCTP estar presente dois *pools* celulares, um relacionado com a proliferação celular e outro relacionado com a comunicação celular e liberação de histamina. Existem outras hipóteses como existência em alguns animais de mais de um gene para TCTP ou a ocorrência de *splicing* alternativo. Porém, o fato de que animais que possuam um único gene codificando TCTP possam ou não secretar a proteína deixa claro que a diferente expressão tecidual e a regulação da sua localização são fatores determinantes da função (THIELE *et al.*, 2000; AMZALLAG *et al.*, 2004; HINOJOSA-MOYA *et al.*, 2008).

2.3.3 Regulação do ciclo celular

A primeira função intracelular descrita para TCTP foi à ligação e estabilização de microtúbulos (GACHET *et al.*, 1999; YAM *et al.*, 2002; BURGESS *et al.*, 2008). A proteína TCTP se liga ao fuso mitótico durante a transição da metáfase para anáfase, permanecendo estável durante as fases G1, S e G2. Essa ligação ocorre predominantemente nos polos (BURGESS *et al.*, 2008; KUBIAK *et al.*, 2008). Além disso, ela possui sítios de ligação a tubulina. Estudos demonstraram que um aumento na expressão de TCTP gera um atraso no crescimento celular, estabilização dos microtúbulos e alteração na morfologia celular (GACHET *et al.*, 1999; BOMMER, 2012). A TCTP também interage com filamentos de actina, essa proteína foi encontrada em um subconjunto rico em fibras de actina nas células migratórias (BAZILE *et al.*, 2009). Além disso, foi identificado um domínio semelhante ao domínio ligante da actina da cofilina, proteína muito importante na polimerização e despolimerização dos filamentos de actina (TSAROVA *et al.*, 2011). Bazile e colaboradores (2009) também demonstrou que a interação entre a TCTP e os microtúbulos é transiente. Durante a mitose, a TCTP é fosforilada por uma polo-quinase (Plk). Esse evento é necessário para o desligamento da TCTP do fuso mitótico no final da metáfase e a progressão para anáfase. Estudos identificaram dois sítios de fosforilação localizados no *loop* flexível. Mutações nesses sítios geram distúrbios na progressão da mitose (YAM *et al.*, 2002). Várias proteínas nucleares envolvidas na progressão da mitose estão sendo relacionadas à TCTP, regulando os níveis de TCTP ou sendo reguladas pela

TCTP. A Chfr é uma proteína de checagem com papel muito importante na progressão do ciclo celular. Ela é encontrada em grande quantidade próxima ao fuso mitótico e interage com a TCTP durante o ciclo celular auxiliando na estabilização dos microtúbulos (BURGESS *et al.*, 2008)). A TCTP também interage com duas proteínas nucleares, a nucleofosmina e nucleolina em células tronco embrionárias (JOHANSSON *et al.*, 2010¹; JOHANSSON *et al.*, 2010²). A superexpressão de TCTP leva a degradação da fosfatase cdc25c por ubiquitinação no proteossomo. Esta fosfatase é essencial para ativação de cdk1; e a diminuição da atividade cdk1 gera rápida saída da mitose e perda da segregação cromossômica (GACHET *et al.*, 1999; JOHANSSON *et al.*, 2010²; BRIOUDES *et al.*, 2010). A proteína TCTP é ubiquitinada e parcialmente degradada no proteossomo durante a mitose, sendo a regulação dos níveis de TCTP essenciais para regular a saída da célula da mitose (KUBIAK *et al.*, 2008).

2.3.4 Atividade anti-apoptótica

A proteína TCTP foi denominada fortilina por sua atividade antiapoptótica. Estudos iniciais demonstraram que a superexpressão de TCTP protege as células HeLa previamente tratadas com etoposide (indutor de apoptose). Altos níveis de TCTP protegem parcialmente a célula da apoptose induzida por Ca^{2+} . Esta proteína é capaz de interagir com outras duas proteínas anti-apoptóticas, Mcl-1, da família Bcl-2 (que regula a ativação das procaspases) e Bcl-X. Inicialmente, Zhang e colaboradores (2002) sugeriram que a Mcl-1 seria uma chaperona, estabilizando TCTP. Entretanto, trabalhos posteriores mostraram que a proteína TCTP liga-se a Mcl-1 e a estabiliza por impedir sua degradação pela via de ubiquitinação. Dessa forma a TCTP funcionaria como uma chaperona, que quando não é expressa permite a degradação de Mcl-1 pela ubiquitinação dependente de proteossomo. Outra explicação relaciona a TCTP como uma co-fator de Mcl-1, permitindo sua atividade. Estudos demonstraram que a TCTP e a Mcl-1 estabilizam uma a outra mutuamente, porém suas funções anti-apoptóticas são independentes (LI; ZHANG; FUJISE, 2001; ZHANG *et al.*, 2002; GRAIDIST *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2005; GRAIDIST *et al.*, 2007; BOOMER, 2010).

2.3.5 Relação entre TCTP e P53

O antagonismo entre a TCTP e a P53 (uma das mais importantes

proteínas apoptóticas) foi proposto como um mecanismo pelo qual a TCTP previne a morte celular por apoptose. Estudos mostraram que o aumento da expressão de TCTP em carcinoma de pulmão reverteu a apoptose mediada por P53, enquanto o *knock-down* aumentou a apoptose (RHO *et al.*, 2011). Dessa forma alguns autores demonstraram que a TCTP interage com a P53 inibindo a apoptose mediada por P53 (CHEN *et al.*, 2011). Diferentes estudos sugeriram diferentes sítios de ligação de TCTP para P53 e diferentes mecanismos de antagonismo. Rho e colaboradores (2011) sugeriram que a P53 liga-se ao domínio interno da TCTP, no domínio α -hélice e que o antagonismo acontece, pois a TCTP atua desestabilizando P53. Já Chen e colaboradores (2011) relataram que a P53 se liga as partes C e N-terminal da proteína TCTP (folha- β) e que o antagonismo ocorre, pois a TCTP bloqueia a ativação transcrricional induzida por P53 de Bax (proteína pró-apoptótica). Estudos recentes sugeriram um *feedback* entre TCTP e P53 no qual a TCTP promove a ubiquitinação mediada por MDM2 e degradação da P53. Consequentemente P53 reprime a transcrição de TCTP (AMSON *et al.*, 2011).

2.3.6 Interação com proteína G

A TCTP pode atuar como um GEF (*guanine exchange factor*) ou uma proteína acessória para ativação da GTPase Rheb, um importante componente da via de sinalização da proteína mTOR, que tem papel central no controle do ciclo e da proliferação celular (HSU *et al.*, 2007). Entretanto, a atividade de GEF foi questionada por outros autores, em função da modesta taxa de troca de nucleotídeos e pelo fato de que alterações nos níveis de TCTP não afetam algumas proteínas na via mTOR em que a Rheb está presente, como seria esperado. A atuação da proteína TCTP como um GEF da Rheb ainda é muito controversa e recentemente Dong e colaboradores (2009) sugeriram o mecanismo molecular desta possível função biológica da proteína, afirmando que a TCTP acelera a troca GDP-GTP da Rheb e regula positivamente a via mTOR (REHMANN *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2008; DONG *et al.*, 2009; AMSON *et al.*; 2013).

Outro exemplo da interação com proteínas G é seu envolvimento inibindo fatores de alongamento na síntese protéica eEF1A e eEF1Bbeta (CANS *et al.*, 2003; LANGDON; VONAKIS; MACDONALD, 2004).

2.3.7 Expressão de TCTP em tumores humanos

A proteína TCTP, apesar de ter sido nomeada uma proteína de origem tumoral, também é encontrada em tecidos normais, sendo sua expressão aumentada em diversos tipos de tumores. Dessa forma, ela foi indicada como candidata a marcador tumoral e/ou alvo terapêutico em câncer pulmonar, colorretal, hepático, ósseo, de mama e leucemia (KIM *et al.*, 2008; NIFOROU *et al.*, 2008; ZHU *et al.*, 2008; SLABY *et al.*, 2009; AMSON *et al.*, 2011; AMSON *et al.*, 2012).

A TCTP é expressa em quase todos os tipos de câncer (células e tecidos), mas em diferentes níveis (THIELE *et al.*, 2000). Na última década cresceram as evidências de que a TCTP está possivelmente relacionada ao câncer. Estudos relataram que os níveis de TCTP estão relacionados ao crescimento, propriedade antiapoptóticas e tumorigênese. Além disso, foi sugerida a utilização da TCTP como um marcador de câncer de pulmão (AMSON *et al.*, 2011) e carcinoma hepatocelular (CHAN *et al.*, 2012). Trabalhos utilizando amostras de câncer de cólon indicam que há um aumento de TCTP em adenomas e adenocarcinomas de cólon, comparado com o tecido normal em ensaios de imunohistoquímica (KIM *et al.*, 2008).

A via mais provável através da qual a TCTP poderia promover o câncer está relacionada à sua atividade antiapoptótica. Análoga a Bcl-2, Mcl-1 e Bcl-X, a superexpressão de TCTP evita a morte celular por apoptose. Além disso, estudos demonstraram que a diminuição da expressão de TCTP em células LNCaP (células de câncer de próstata humano) está relacionada a redução da viabilidade celular (GNANASEKAR *et al.*, 2009).

Lucibello e colaboradores (2011) demonstraram que células MDA-MB231 com aumento nos níveis de TCTP são menos sensíveis ao estresse oxidativo. Além disso, seus resultados mostram que a *downregulation* de TCTP torna as células mais sensíveis (LUCIBELLO *et al.*, 2011). Outros estudos demonstraram que a super-expressão de TCTP em células de carcinoma de ovário resulta em uma maior degradação de TSC-22 e o *knockdown* da TCTP aumenta a apoptose. Assim, a interação entre TCTP e TSC-22 previne apoptose via desestabilização de TSC-22 em células de carcinoma de ovário (LEE *et al.*, 2008).

Outra importante maneira pela qual a TCTP promove o câncer é através da interação com a P53. Amson e colaboradores (2011) demonstraram que em

50 pacientes com câncer de mama, altos níveis teciduais de TCTP estão associados a tumores agressivos e com baixo prognóstico. O *knockdown* de TCTP em células primárias de tumor mamário em camundongos ErbB2 leva a um aumento de P53 e diminuição do número de células tronco cancerosas (AMSON *et al.*, 2011; BOOMER, 2012).

Ma e colaboradores (2010) descobriram que em células de adenocarcinoma de cólon a superexpressão de TCTP leva a expressão de componentes do sistema ubiquitina proteossoma, biossíntese de citoesqueleto e metástase (MA *et al.*, 2010). Além disso, outros estudos propõem um mecanismo distinto de tumorigênese dependente de TCTP. Esse mecanismo é baseado no estudo de CHD1L, que dirige a transcrição do gene TPT1 e atua como oncogene em aproximadamente 50% dos carcinomas hepatocelulares humanos. A superexpressão de TCTP está relacionada com o estado avançado do tumor. Essa proteína induz a saída rápida da mitose e a má segregação cromossômica, resultando em instabilidade cromossômica (CHAN *et al.*, 2012).

2.3.8 TCTP no modelo de reversão tumoral e como alvo para drogas anti-câncer

A importância da TCTP foi demonstrada no modelo de reversão de tumores. Este modelo está baseado num raro evento no qual as células tumorais passam do fenótipo maligno a um fenótipo mais próximo do normal. Telerman e colaboradores (2009) identificaram genes envolvidos nesse processo, dentre os quais o gene da TCTP mostrou ser o mais importante. Além disso, a inibição da expressão de TCTP por técnicas de RNA de interferência resultou na supressão do fenótipo maligno (TELERMAN *et al.*, 2009). Seus estudos indicam que a diminuição dos níveis de TCTP em linhagens de melanoma humano reverte o fenótipo maligno e a inibição da expressão de TCTP leva a um fenótipo de reversão tumoral em células NIH3T3, portanto a redução dos níveis de TCTP relaciona-se drasticamente à reversão (TUYNDER *et al.*, 2004). Outros estudos demonstraram que TCTP, CDC2 e PCNA são sub-regulados no processo de reversão tumoral (GE *et al.*, 2011; BOOMER, 2012).

Além disso, o silenciamento do gene da proteína TCTP por siRNA em células de câncer de próstata reduz o crescimento celular e induz a apoptose (GNANASEKAR *et al.*, 2009). Foi ainda verificada a redução da expressão da proteína TCTP em células de câncer de cólon em resposta ao tratamento com Oxilaplatin (YAO *et al.*, 2009). A proteína TCTP também foi identificada como

um possível alvo da droga Artemisina (fármaco antimalárico e tóxico para células cancerosas) capaz de alquilar e inativar a proteína presente no citoplasma de *Plasmodium falciparum* (BHISUTTHIBHAN;MESHNICK, 2001; EFFERTH, 2007; TELERMAN; AMSON, 2009). Tuynder e colaboradores (2004) testaram o uso de drogas para suprimir os níveis proteicos de TCTP em células U973, o que resultou na indução de citotoxicidade nessas células. Todas as observações sugerem que a TCTP pode ser um biomarcador para testar a eficiência de drogas para o tratamento do câncer (TUYNDER *et al.*, 2004).

Alguns genes de susceptibilidade ao melanoma já foram descritos em parentes afetados pela doença e validados em modelos animais. Dentre eles estão às mutações herdadas nos genes CDKN2A (HOCKER; TSAO, 2007) e CDK4 (SOTILLO *et al.*, 2001), as mutações espontâneas em BRAF (DAVIES *et al.*, 2002; HOCKER; TSAO, 2007), NRAS (HOCKER AND TSAO, 2007) e TP53 (HUSSEIN *et al.*, 2003). O melanoma pode ser resultado da modulação epigenética da expressão gênica, sendo muitos genes desregulados por metilação do DNA, assim como por modificações em histonas (MUTHUSAMY *et al.*, 2006; ROTHHAMMER; BOSSERHOF, 2007).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

A maioria dos sais, compostos orgânicos, ácidos e solventes orgânicos utilizados no trabalho foram adquiridos da Merck (Darmstad, Alemanha). Da Sigma (St. Louis, EUA) foram adquiridos a Soro Albumina Bovina, β -mercaptoetanol, marcadores de massa molecular utilizados nos géis de poliacrilamida, além dos anticorpos anti-IgG de coelho conjugados com fosfatase alcalina utilizados no ensaio de Western Blot. Os reativos BCIP e NBT utilizados em reações de WB, bem como o brometo de etídio utilizado para visualização de géis de DNA, foram adquiridos da Promega (Madison, EUA). Os reagentes dodecil sulfato de sódio, corante Azul de Coomassie, Tris, Glicina, Uréia, Thio-Uréia, Persulfato de Amônio, foram adquiridos da GE (Grand Island, NY, EUA). Da empresa Fermentas (Burlington, Canadá) foram adquiridos os reagentes para biologia molecular: marcadores de massa molecular, enzima Taq polimerase, juntamente com os tampões necessários, além dos dNTPs. Os oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR foram produzidos sob encomenda pela IDT (Coralville, IA, EUA). O DEPC foi adquirido da USB (Cleveland, OH, EUA). A agarose e o TRIzol foram adquiridos da Invitrogen (Carlsbad, EUA).

3.2 Cultivo Celular

As linhagens celulares B16-F1 e B16-F10 foram obtidas da American Type Tissue Culture Collection- ATCC (Manassas, USA). As células de melanoma murino, B16-F1 e B16-F10, foram mantidas em Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM, Cultilab, Campinas, Brasil) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil). Em todos os meios foi adicionado 40 mg/L de gentamicina (Schering-Plough, Kenilworth, New Jersey, USA). As células foram mantidas a 37°C, em atmosfera úmida com 5 % de CO₂.

3.3 Preparo de Extratos Proteicos Celulares

Para avaliação da presença de TCTP nas linhagens foi realizada extração de proteínas totais. Extratos proteicos das linhagens celulares B16-F1, B16-F10, B16-F10 TCTP siRNA50, B16-F10 TCTP siRNA100, B16-F10 C-50 (controle negativo 50nM) e B16-F10 C-100 (controle negativo 100 nM) foram obtidos de aproximadamente 10^5 células. As células foram retiradas e ressuspensas em 500 μ L de tampão de lise gelado (20 mM Tris-HCl pH 7,6, 50 mM KCl, 400mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,2 mM PMSF, 2 mg/mL aprotinina, 2 mg /mL leupeptin, 1 mM ditiotretol, 1% Triton X-100 e 20% glicerol). Após ressuspensão foram sonificadas a potencia de 75 por 30 segundos a 4°C, os tubos foram então centrifugados a 20.000 xg por 20 min a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e a quantidade de proteína foi dosada pelo método Micro BCA ProteinAssay Kit (ThermoScientific, Waltham, USA).

3.4 Dosagem de Proteínas pelo Método MicroBCA

A dosagem de proteínas foi realizada pelo Kit Micro BCA Protein Assay Kit (ThermoScientific, Waltham, USA), em leitor de placas de 96 poços (Meridian ELX 800). A curva padrão foi construída com diferentes concentrações (0 μ g/mL – 200 μ g/mL) de Soro Albumina Bovina (BSA) dissolvida em água e as amostras foram diluídas para entrarem na região de linearidade da curva. Sendo a leitura realizada em 610 nm.

3.5 Eletroforese Bidimensional

Extratos celulares de B16-F1 e B16-F10 foram submetidos aos procedimentos do kit 2-D clean up (GE Healthcare), para retirada de sais e nucleotídeos que interferem na focalização isoeletrica das proteínas. Após o clean up, as amostras foram solubilizadas em tampão de reidratação (7 M uréia, 2 M Tiouréia, 2% CHAPS, 0,5% Tampão IPG pH 6-11 ou pH 3-10, 0,002% Azul de Bromofenol e 100 mM DTT) (RASMUSSEN *et al*, 1992) e dosados com kit 2-D Quant Kit (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante. Amostras de 100 μ g de cada extrato, diluídas em 250 μ L de tampão de reidratação, foram utilizadas para reidratar as fitas de géis com anfólitos imobilizados (DryStrip). A reidratação das fitas de pH 3-10 foi realizada de forma passiva à temperatura ambiente por 16 h em suporte apropriado (IPG-Box®, GE Healthcare). Imediatamente após o término da reidratação, as fitas foram submersas em óleo mineral, suas extremidades

foram protegidas com papéis filtro umedecidos com 200 μ L de água MiliQ e os eletrodos foram posicionados acima dos papéis protetores e fixados. A focalização isoeletrica foi realizada a 20°C, com acúmulo de 15500 V em total de 5 h em equipamento IPGphor® (GE Healthcare) programado com os seguintes passos: 500V por 1h; 1000 V por 1 h e 8000 V por 1 h e no quarto estágio 8000 V por 1 hora a 50 μ A/fita. Ao término da focalização, as fitas foram retiradas do equipamento e armazenadas a -20°C por 16 h. Os géis desnaturantes gradientes (14-18%) de poliacrilamida foram preparados e polimerizados à temperatura ambiente. Para a corrida da segunda dimensão, as fitas foram descongeladas e incubadas em tampão de equilíbrio (6 M uréia, 30% glicerol, 2% SDS) contendo 65 mM DTT para redução das pontes dissulfeto, por 15 min, sob agitação, à temperatura ambiente. Após a redução, o tampão foi trocado por tampão de equilíbrio contendo 135 mM Iodacetamida (IAA) para alquilação das cisteínas, por 15 min, sob agitação, à temperatura ambiente. A corrida eletroforética foi realizada em corrente constante de 45 mA a 15°C. Ao final da corrida, os géis foram corados com Coomassie coloidal ou transferidos para nitrocelulose. Para a coloração, os géis foram mantidos sob agitação em todos os passos que incluíram: incubação em solução de fixação (ácido orto-fosfórico 1,3% e metanol 20%) por 1h, incubação em solução corante (Coomassie G-250 2,5% em ácido orto-fosfórico 2% e sulfato de amônio 10%) por 16 a 48 h, incubação em solução de neutralização (Tris 0,1 M pH 6,5; ajustado com ácido orto-fosfórico) por 3 minutos, lavagem em metanol 20% por 30 segundos, seguido de incubação em solução estabilizante (sulfato de amônio 0,2%) por 1 h e incubação em solução de armazenamento (ácido acético 1%). Os géis foram digitalizados no Image Scanner III (GE Healthcare) e analisados.

3.6 Immunoblotting Bidimensional

Após focalização e corrida eletroforética em gel desnaturante de poliacrilamida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose por 1 h, com voltagem constante (100 V) a 4°C. Em seguida, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado em pó diluído em PBS 3% (p/v) por 1h e incubadas com soro hiperimune anti-LiRecTCTP (diluído na mesma solução de bloqueio) ou com soro pré-imune (controle negativo) na diluição de 1:5000 obtidos por SADE e colaboradores (2012) , por 2 h à temperatura ambiente e sob constante agitação. As membranas foram lavadas com o mesmo tampão, na ausência de anticorpo, e incubadas com anticorpos secundários anti-IgG de

coelho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma) por 1h à temperatura ambiente. Após lavagens, a reação foi revelada com o substrato BCIP e o cromógeno NBT (Promega) em tampão ótimo para atividade de fosfatase alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM e MgCl 5 mM).

3.7 Extração de RNA

A extração do RNA foi baseada no método de TRIzol® (CHOMCZYNSKI, 1993). Aproximadamente 10^5 células foram adicionados 300 μ L de TRIzol®, sendo homogeneizadas com homogeneizador de tecidos (Tecnal, São Paulo, Brasil). Após 5 min em temperatura ambiente, foram adicionados 200 μ L de clorofórmio, os microtubos foram vigorosamente agitados por 15 segundos e centrifugados a 20.000 x g por 20min a 4°C. Após a centrifugação, três fases foram formadas: a fase aquosa contendo RNA, uma fase protéica e a fase orgânica contendo DNA genômico. A fase aquosa foi retirada cuidadosamente e foram adicionados 500 μ L de isopropanol e os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 10min para precipitação do RNA. Após centrifugação (20.000xg, 30min, 4°C), o sobrenadante foi descartado e 1 mL de etanol 75% foi adicionado para lavar o pellet de RNA, procedendo-se nova centrifugação por 5 min. Após retirada do sobrenadante, os microtubos foram abertos em fluxo laminar, imersos em gelo, até secar o pellet que foi posteriormente ressuspedido em 13 μ L de água ultrapura tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). A integridade do RNA foi verificada através de corrida eletroforética em gel de agarose 1%. O RNA foi então dosado no NanoVue (GE Healthcare, UK), analisando a razão 260/ 280nm para avaliar a relação de ácido nucléico extraído em relação as proteínas (contaminantes).

3.8 RT-PCR

Com o intuito de obter o segmento de cDNA específico para TCTP e GAPDH (controle endógeno), o RNA total das células de melanoma murino foi submetido a reações de RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa) para obtenção do cDNA correspondente ao RNAm de ambas as linhagens. Para as reações foi utilizado o kit Hight Capacity RNA to cDNA Master Mix (Applied Biosystems). Foram adicionados 4 μ L da Master Mix (5X), 1 μ g de RNA total e água DEPC tratada suficiente para 20 μ L em um microtubo para PCR. Os microtubos foram submetidos aos ciclos em termociclador (MyCycler – ThermalCyclerBioRad) de 25°C/5min, 42°C/30min, 85°C/5min e 4°C/ ∞ (ciclo de espera).

3.9 PCR

Para a reação de PCR propriamente dita, foram utilizados 2 µl do cDNA obtido na reação anterior, além de tampão para Taq DNA polimerase (1X), MgCl₂ (1,5mM); dNTPs mix (0,2 mM); oligonucleotídeo “sense”, da TCTP (GAG CTG TTC TCC GAC ATC TAC AAG) e da GAPDH (AAC GAC CCC TTC ATT GAC CTC) 0,2 µM; oligonucleotídeo “anti-sense” da TCTP (AGT CAC ACC ATC TTC ACG GTA GTC) e da GAPDH (TCC ACC ACC CTG TTG CTG TAG) 0,2 µM e Taq DNA polimerase (1,25 U) para um volume final de reação de 20 µl. Os oligonucleotídeos foram desenhados a partir da sequência completa de TCTP e GAPDH seguindo informações em Sambrook & Russel (2001). Esta mistura foi incubada em termociclador: 94°C/2min (1 ciclo); 94°C/30s, 61°C/30s para GAPDH e 60°C/30s para TCTP, 72°C/2min (35 ciclos); 2°C/5min (1 ciclo); 4°C/∞ (ciclo de espera).

3.10 Eletroforese de DNA em Gel de Agarose

Os produtos de PCR ou RT-PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% (para análise de RNA total extraído) ou 2% (para análise do cDNA e DNA obtido a partir da reação de PCR com oligonucleotídeos específicos para TCTP, GAPDH, PCNA e β-actina) (m/v), em tampão TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1mM, pH 7,5). O gel de agarose foi preparado contendo brometo de etídio a 0,5 µg/ml. Após a corrida, a visualização das bandas e registro da imagem foi feito sob luz ultravioleta e com auxílio do programa ChemiDoc TM MP System.

3.11 PCR em Tempo Real

A análise quantitativa de PCR em tempo real (qRT-PCR) foi realizada a fim de avaliar e comparar a expressão do gene *tpt1* da TCTP nas duas linhagens celulares e na linhagem silenciada. Para tanto foi utilizado o Kit Power SYBR® Green RNA-to-CT 1-Step Kit (Applied Biosystems). Para detectar a expressão de TCTP foram utilizados os oligonucleotídeos já validados segundo Primer Bank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) TCTP-F 5'-CATCAGCCATGACGAGCTGTT-3'; TCTP-R 5'-CTCTGTTCTACTGACCATCTTGC-3'. Para detectar a expressão do gene GAPDH (controle endógeno) também foram utilizados primers validados segundo Primer Bank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) GAPDH-F 5'-TGGATTTGGACGCATTGGTC-3'; GAPDH-R 5'-TTTGCACTGGTACGTGTTGAT-3'. Cada PCR em tempo real foi realizado em

apenas um passo, utilizando RNA equivalente a 10 pg do RNA total de acordo com as recomendações do fabricante, num volume final de 20 μ L. Todas as amostras foram realizadas em pentaplicata e foram submetidas a 40 ciclos de amplificação em AppliedBiosystems StepOnePlus Real-Time PCR System. Para quantificação foi empregado o método $\Delta\Delta C_t$, utilizando GAPDH como padrão endógeno para cada amostra. Para os gráficos, o $\Delta\Delta C_t$ foi normalizado para os controles e expresso em diferença de percentagem.

3.12 Teste de Transfecção

Para determinar a quantidade de lipofectamina (Invitrogen, Carlsbad, USA) e de duplex utilizada para transfecção dos duples para siTCTP e não do controle negativo, foi utilizado o kit The BLOCK-iT Transfection Kit (Life Technologies, Carlsbad, California, USA). Para tanto foram plaqueadas 10^5 células B16-F10 em placa de 24 poços (Techno Plastic Products, Transadigen, Suíça) em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. No dia seguinte as células foram transfectadas na concentração final de 50 nM e 100 nM de RNAi fluorescente utilizando 1, 2, 3 e 4 μ L de lipofectamina. Após 6 horas de transfecção o meio foi substituído por DMEM sem soro fetal bovino. 24, 48 e 72 horas de transfecção as células foram fotografadas em microscópio invertido de fluorescência Olympus IX71 com emissão em 494nm e excitação em 519nm- filtro verde e analisadas com auxílio do programa Olympus DP2- BSW.

3.13 Silenciamento por RNA de Interferência

Os duplex de siRNA para TCTP e para o controle negativo foram sintetizados pela Ambion (Life Technologies, Carlsbad, California, USA). A sequência de siRNA específico para o gene *tpst1* que codifica a TCTP foi: “sense” AGCACAUCCUUGC UAAUUUtt e “antisense” AAAUUAGCAAGGAUGUGCUta. Células B16-F10 foram plaqueadas em placas de 6 poços (10^5 células por poço), 24 poços (10^5 células por poço), garrafas médias (10^5 células por garrafa) e placas de 96 poços (10^4 células por poço) em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. No dia seguinte as células foram transfectadas na concentração final de 50 nM e 100 nM de RNAi (si) e do controle negativo (s) usando lipofectamina (Invitrogen, Carlsbad, California USA). Após 24, 48 e 72 horas de transfecção as células foram coletadas para ensaios de proliferação, migração,

adesão, viabilidade, western blott e PCR em tempo real.

3.14 Proliferação Celular

Células B16-F1 e B16-F10 foram plaqueadas em placas de 96 poços na densidade de 10^4 células/poço em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Células B16-F10 foram transfectadas com RNAi para TCTP ou controle negativo e mantidas por 24, 48 e 72 horas. Após esse período, as células foram lavadas com tampão PBS e fixadas com Paraformaldeído 4%. Após 10 minutos foi adicionado 100 μ L de metanol 2%. Posteriormente as células foram coradas com cristal violeta 0,5% por 10 minutos. A placa foi então lavada e o corante impregnado nas células solubilizado com 100 μ L de citrato de sódio 0,1M (metanol 50%, pH 4,2). A reação foi medida em espectrofotômetro (TECAM Intinite M200) em 550 nm.

3.15 Viabilidade Celular

Placas de 96 poços contendo 10^4 células por poço de B16-F1 e B16F10 foram transfectadas ou não com RNAi para TCTP ou controle negativo. Após 24, 48 e 72 horas de transfecção o meio foi aspirado e foi adicionado às células 100 μ L de uma solução 0,5 mg/ml (50 μ g) de MTT (Sigma, St. Louis, USA) em PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄ pH7,4). As células foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C durante 3 horas. O meio contendo MTT foi cuidadosamente retirado e 100 μ L de DMSO (Sigma, St. Louis, USA) foram adicionados em cada poço. A reação foi medida em espectrofotômetro (TECAM Intinite M200) em 550 nm.

3.16 Migração Celular por *Scratch*

Células B16-F1 e B16-F10 (1×10^4 por poço) foram plaqueadas em placa de cultura de 24 poços e transfectadas ou não com Lipofectamina e RNAi para TCTP ou o controle negativo “scrambled” e foram mantidas em meio DMEM. Após 4 horas de transfecção, com auxílio de uma ponteira de 10 μ L foi realizado um “Scratch” (Rodriguez *et al.*, 2005), isto é, um risco na placa removendo as células e o meio substituído por DMEM sem soro fetal bovino. Logo após o “Scratch” as células foram fotografadas em um microscópio Olympus IX71 e câmera de captura Sony Cyber-shot DSC-W35 nos tempos 0, 6, 24 e 48 horas. A distância entre as duas margens foi medida utilizando o programa Image Pro-Plus 6.0 em todos os tempos capturados. Dessa

forma, a distância da hora zero foi subtraída da hora 24 até 72 determinando a taxa de migração celular.

3.17 Migração Celular por *Transwell*

O potencial migratório das células da linhagem B16 foi determinado em ensaio utilizando as câmaras de cultura Transwell 8µm (Corning, NY, NY, USA). Foram plaqueadas 5×10^4 células com meio DMEM livre de soro na câmara superior. Na câmara inferior foi adicionado meio DMEM contendo 10% de soro fetal. As células foram incubadas por 6 h a 37°C a 5%CO₂. Após incubação as células foram soltas utilizando PBS-EDTA 10 mM (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂ PO₄; 10 mM EDTA) (e contadas em hemocitometro. Os dados obtidos foram analisados utilizando One-way ANOVA utilizando pós teste de Tukey (n=3).

3.18 Ensaio de Adesão

Placas de 96 poços foram tratadas com 15 µg/mL de matrigel, colágeno tipo I, laminina, fibronectina e vitronectina diluídas em PBS. Após incubação de 16 horas a 40°C, os poços foram lavados para retirar as proteínas não ligadas e então bloqueados com 1% BSA por 2 horas a 37°C. Células B16-F1, b16-F10, B16-F10 transfectadas com 50 e 100nM de RNAi para TCTP e controle negativo foram soltas das placas, contadas em câmara de Neubauer e ressuspensas em tampão HEPES (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mg/mL D-glicose, pH 7,4) acrescido de cátions divalentes (Mg²⁺ e Ca²⁺ na concentração de 1 mM cada). Depois disso, as células foram plaqueadas (105 células/poço) sobre os poços previamente tratados e as placas mantidas a 37°C durante duas horas para que ocorresse a adesão. Os poços foram lavados três vezes para remoção das células não aderidas. As células aderidas foram coradas com azul de metileno (0,4% de azul de metileno em 30% metanol). O corante foi extraído (0,5% ácido acético, 50% metanol) e a absorbância foi mensurada em 650 nm (LUQUE et.al., 1994). Esses ensaios foram realizados em pentaplicatas em 3 experimentos independentes.

3.19 Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à análise estatística, sendo as repetições e o tratamento avaliados. Os resultados dos ensaios *in vitro* foram submetidos à análise de variância (ANOVA - duplo sem repetição); e para avaliar as diferenças entre os tratamentos e controle foi utilizado o teste de Tuckey que permite estabelecer a diferença mínima significativa entre duas médias. A significância foi definida como $p < 0,05$; $p < 0,01$ ou $p < 0,001$.

4. RESULTADOS

A fim de caracterizar o perfil proteico e investigar o conteúdo de proteína TCTP nas linhagens celulares de melanoma murino B16-F1 e B16-F10, foram realizadas eletroforeses em gel bidimensional e *Western blotting* utilizando os extratos celulares e os anticorpos policlonais produzidos contra LiRecTCTP (TCTP identificada na glândula e veneno de *Loxosceles intermedia* envolvida no processo inflamatório decorrente da picada da aranha) (SADE *et al.*; 2012). Os perfis proteicos de ambas as linhagens B16-F1 e B16-F10 estão mostrados na figura 4 e são bastante semelhantes, apresentando uma prevalência de proteínas de mobilidade eletroforética aparente entre 40-100 kDa. Foram identificados 126 *spots* no gel referente à linhagem B16-F1, sendo esses *spots* concentrados, em sua maioria, em pl ácidos de 3-5. A linhagem B16-F10 apresentou 201 *spots*, estando esses dispersos na faixa de pH de 3-10. Cada um dos géis apresenta um *spot*, indicado por uma seta, em 20 kDa e com pl de 4,8 (Figura 4). Esse *spot* pode indicar a proteína TCTP presente nas linhagens celulares.

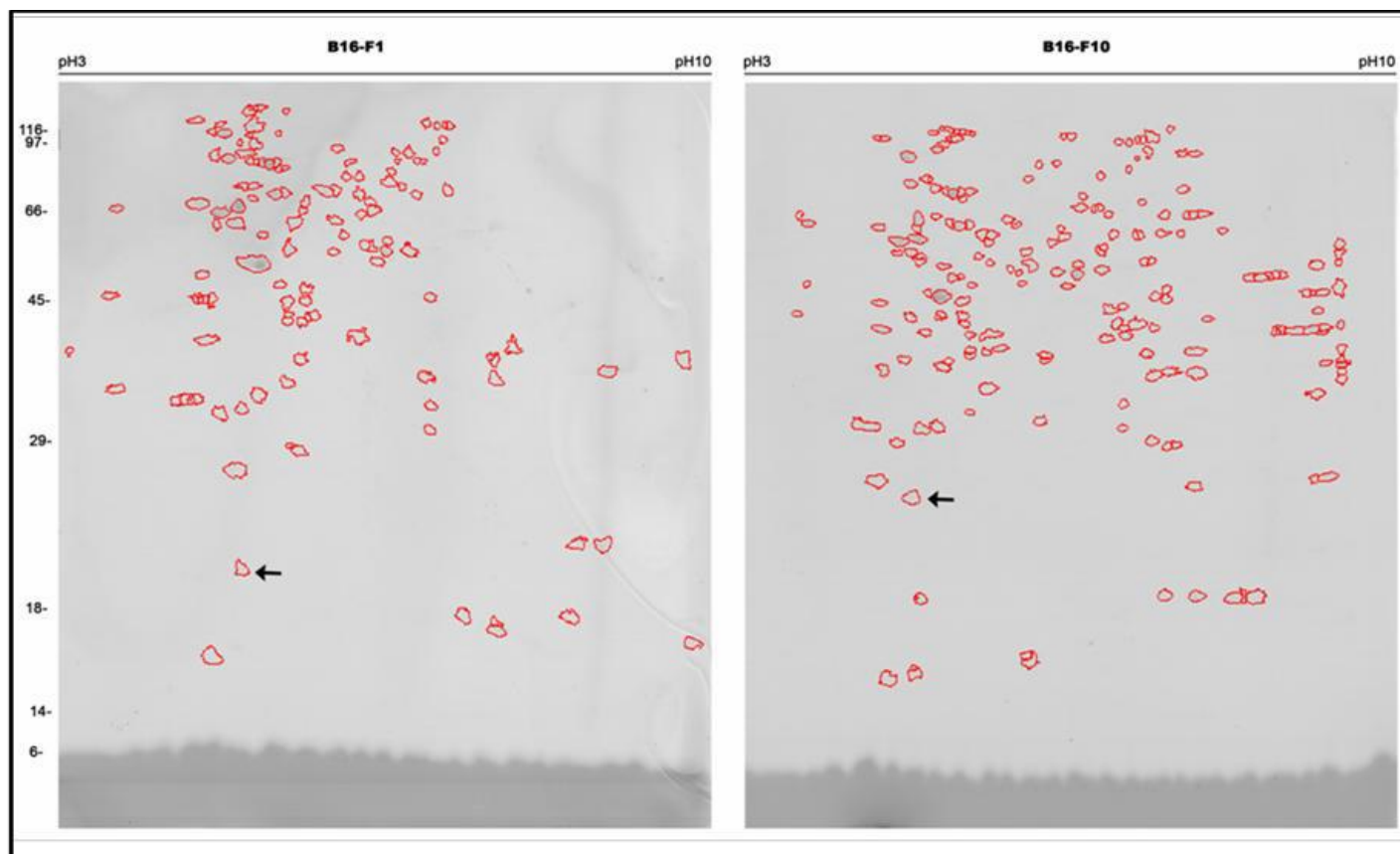


FIGURA 4: Perfil proteico bidimensional dos extratos celulares de B16-F1 e B16-F10. Os géis mostram o perfil proteico bidimensional dos extratos proteicos obtidos das linhagens B16-F1 e B16-F10. A seta aponta o *spot* com pI e kDa, provavelmente referente à proteína TCTP. Acima está indicado o gradiente de pH e à esquerda os massas moleculares em kDa.

Com intuito de identificar os *spots* referentes à TCTP, realizamos imunensaio com anticorpo anti-LiRecTCTP. Nas figuras 5 e 6 é possível visualizar em A os géis da eletroforese bidimensional e em B os *Western blottings* (WB) dos extratos celulares de B16-F1 e B16-F10, respectivamente. As membranas de nitroceluloses (Figuras 5B e 6B) mostram reações positivas aos anticorpos hiperimunes produzidos contra LiRecTCTP. Tais resultados corroboram com a hipótese de que os *spots* observados em 20 kDa e pI 4,8 são referentes a TCTP em ambas as linhagens. Embora os ensaios de WB bidimensionais aqui apresentados não sejam quantitativos, o *spot* identificado na linhagem B16F10 é pronunciadamente mais intenso do que o observado para B16-F1, vale ressaltar que foi utilizada a mesma quantidade de proteína do extrato total (100µg), bem como mesmo tempo de exposição aos reveladores para ambos os extratos. O soro pré-imune foi utilizado como controle e não revelou qualquer reação inespecífica quando exposto aos extratos das mesmas linhagens celulares nas mesmas condições experimentais (dado não mostrado).

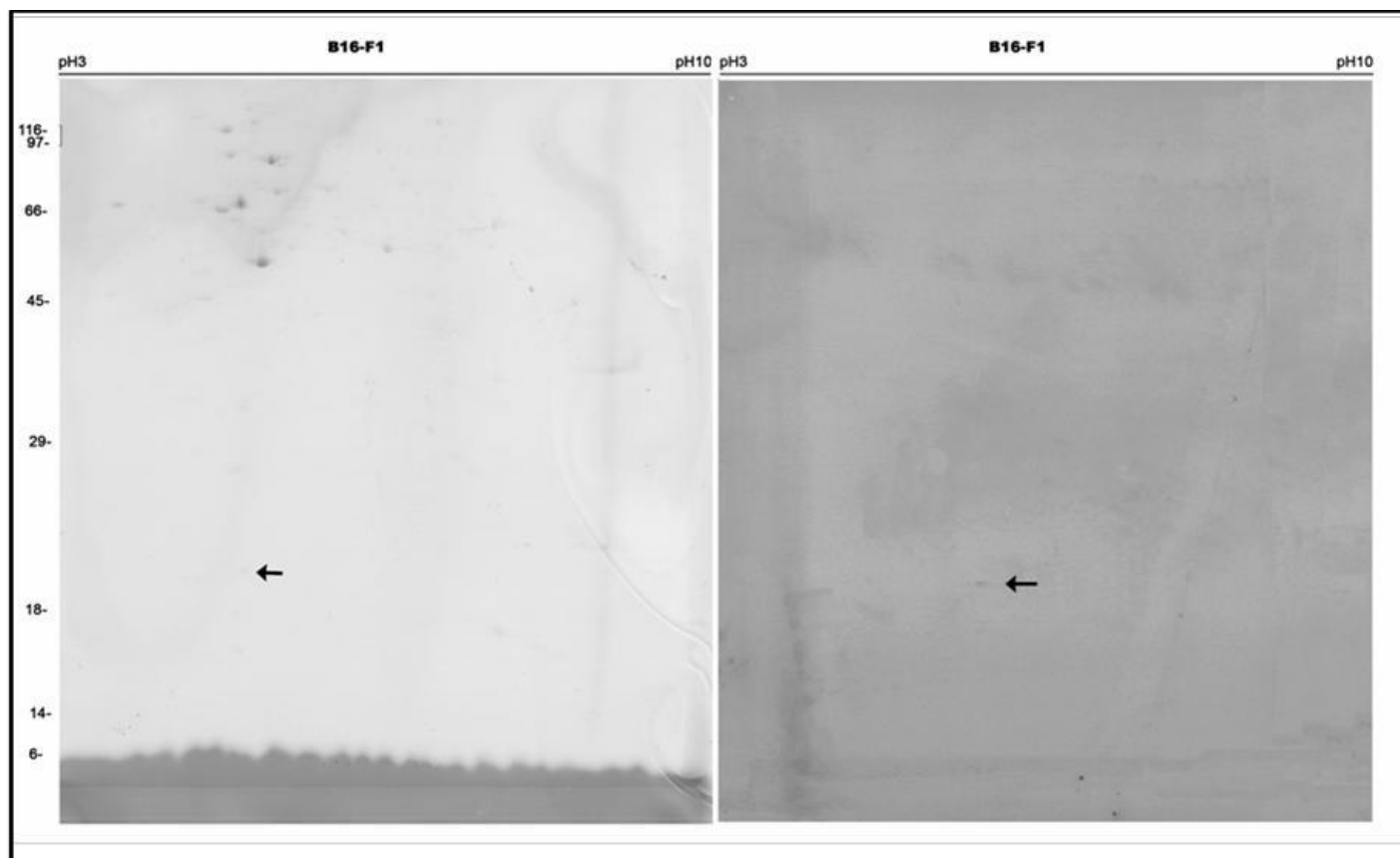


FIGURA 5: Imunoreação do extrato celular de B16-F1 com anticorpos que reconhecem LiRecTCTP. À esquerda: eletroforese bidimensional do extrato de B16-F1 corado com Corante Azul de Coomassie. À direita: nitrocelulose após imunoreação mostrando reconhecimento específico de *spot* pelo soro anti-LiRecTCTP. As setas indicam um *spot* na altura de 20 kDa e pl 4,8, sugerindo a identificação de TCTP. Acima de cada figura está indicado o gradiente de pH e à esquerda estão os marcadores de massa molecular.

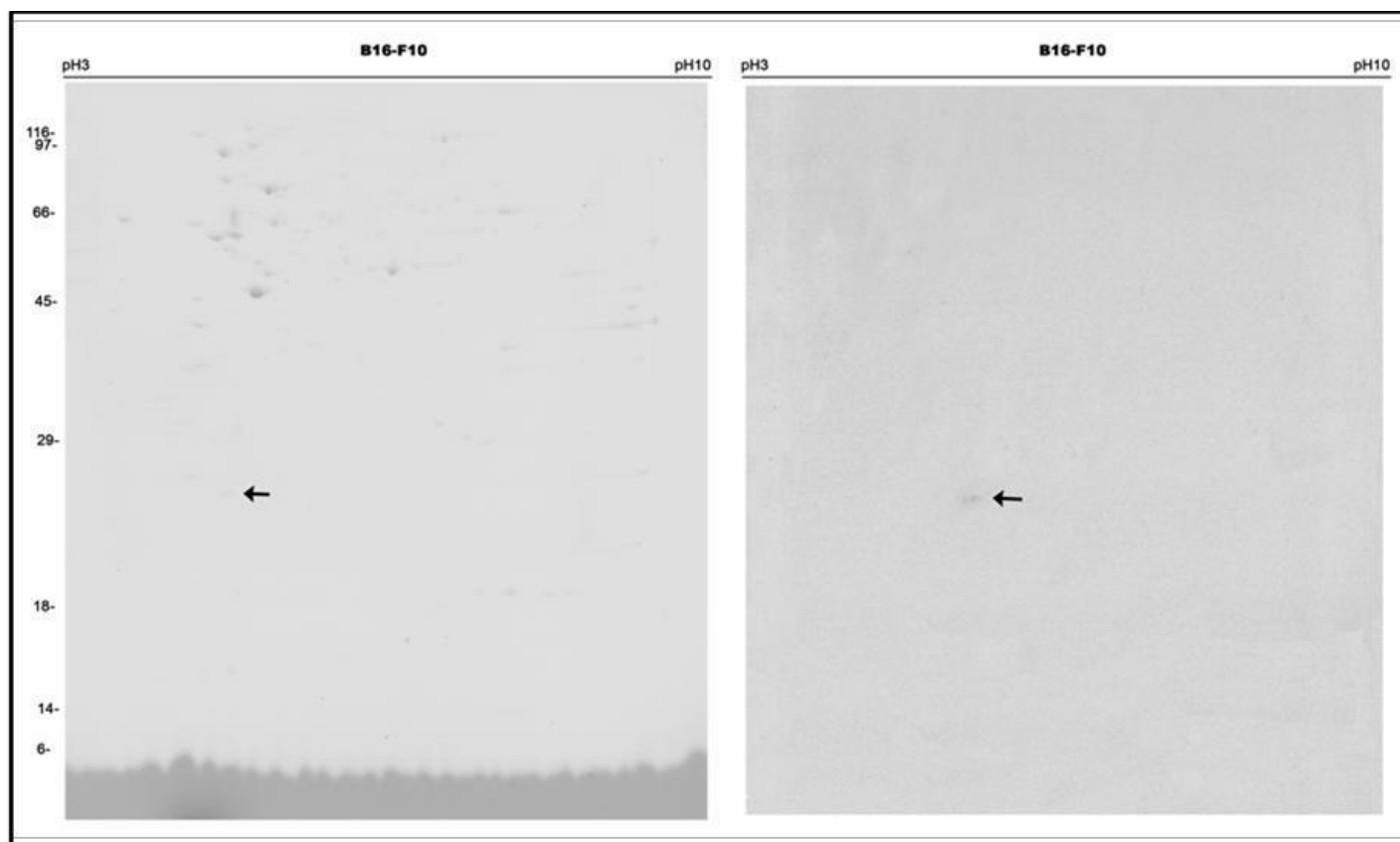


FIGURA 6: Imunoreação do extrato celular de B16-F10 com anticorpos que reconhecem LiRecTCTP. À esquerda: eletroforese bidimensional do extrato de B16-F10 corado com Corante Azul de Coomassie. À direita: nitrocelulose após imunoreação mostrando reconhecimento específico de *spot* pelo soro anti-LiRecTCTP. As setas indicam um *spot* na altura de 20 kDa e pI 4,8, sugerindo a identificação de TCTP. Acima de cada figura está indicado o gradiente de pH e à esquerda estão os marcadores de massa molecular.

Para investigar tal hipótese foi extraído RNA total de ambas as linhagens pelo método de TRIzol® (CHOMCZYNSKI, 1993). O gel da extração do RNA apresentou duas bandas bem definidas referentes aos RNAs ribossômicos 18S e 28S (PROMEGA RNA Analysis Notebook). O RNA total foi dosado e a razão da sua concentração em relação à concentração proteica foi superior a 1.8, considerada ideal segundo Sambrook e Russel (2001). De todo RNA produzido por uma célula, a porcentagem de 80-85% corresponde ao RNA ribossômico e uma pequena porcentagem (1-5%) ao RNA mensageiro (ALBERTS *et al.*, 2004). São esperadas duas bandas de grande intensidade referentes aos RNAs ribossômicos 18S e 28S.

No perfil da eletroforese do RNA total (FIGURA 7) existem duas bandas de grande intensidade que correspondem ao RNA ribossômico e bandas de pouca intensidade de tamanhos variados, visualizadas como um borrão, estas correspondem aos RNAs mensageiros. Esses achados nos mostram que o RNA extraído estava íntegro e com boa qualidade para a execução dos experimentos posteriores.

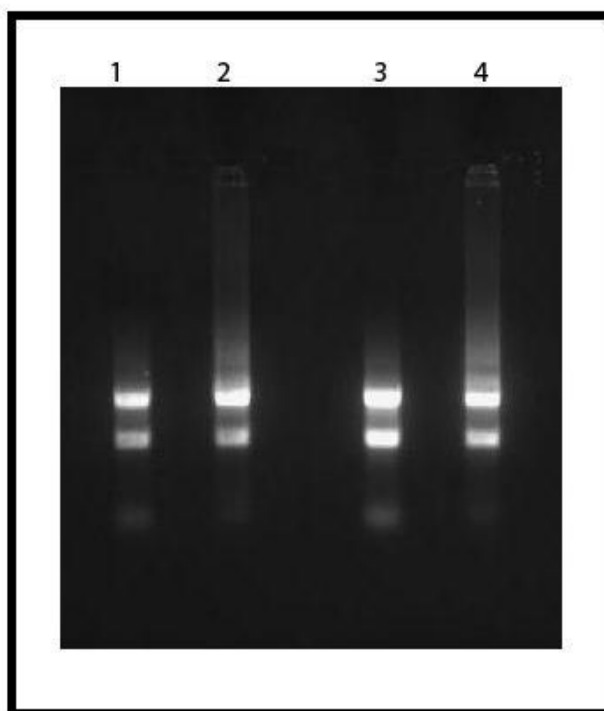


FIGURA 7: Avaliação da qualidade do RNA após extração pelo método de Trizol. RNA total extraído das linhagens B16-F1 e B16-F10 e replicata biológica (duas culturas diferentes das células). Colunas 1 e 2 apresentam o RNA extraído, sendo em 1 extraído de B16-F1 e em 2 de B16-F10. Colunas 3 e 4 apresentam o RNA extraído (replicata biológica), sendo em 3 extraído de B16-F1 e em 4 de B16-F10. Gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo.

A partir desse RNA mensageiro extraído, foram obtidos os transcritos (cDNA) de cada linhagem para TCTP e para GAPDH, com a utilização de oligonucleotídeos específicos e através das reações de RT-PCR e PCR. Para tornar a comparação da transcrição viável, o RNA foi quantificado em espectrômetro de microvolumes (GE Healthcare), assim como o cDNA, a fim de padronizar as quantidades no início de cada reação. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%. Após a corrida, a visualização das bandas e registro da imagem foram realizados sob luz ultravioleta.

Na figura 8 observamos a imagem dos produtos da PCR convencional, há amplificação em torno de 800 pb para GAPDH (colunas 1 e 2) e 350 pb para TCTP (colunas 3 e 4), bandas com tamanho esperado para utilização desses oligonucleotídeos. Também podemos notar uma diferença de intensidade das bandas referentes aos oligonucleotídeos específicos para TCTP, o que não ocorre com oligonucleotídeos específicos para GAPDH (controle endógeno-gene referencia). Esse resultado indica uma diferença na transcrição do gene *tpt1* entre as linhagens B16-F1 e B16-F10. Na coluna 3 temos a amplificação do inserto da TCTP na linhagem B16-F1 enquanto na coluna 4 temos a amplificação do mesmo inserto em B16-F10 (Figura 8).

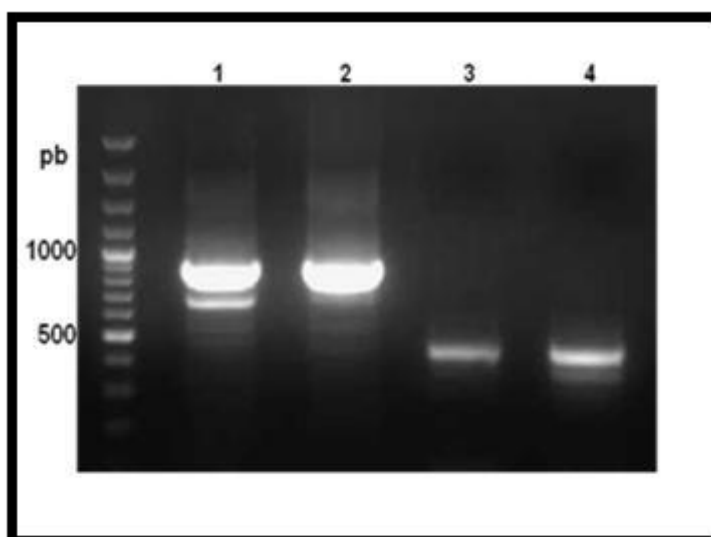


FIGURA 8: Avaliação dos transcritos (TCTP e GAPDH) em PCR. PCR do cDNA amplificado a partir do RNA mensageiro referente as proteínas TCTP e GAPDH (controle) extraídos das linhagens celulares B16-F10 e B16-F1. Colunas 1 e 2 apresentam a amplificação do DNA

referente ao RNAm GAPDH, sendo em 1 extraído de B16-F1 e em 2 de B16-F10. Colunas 3 e 4 apresentam a amplificação do DNA referente ao RNAm TCTP, sendo em 3 extraído de B16-F1 e em 4 de B16-F10. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. Marcadores de pares de base à esquerda.

A fim de quantificar a diferença na expressão relativa de TCTP entre as linhagens celulares B16-F1 e B16-F10, foram realizados ensaios de PCR em Tempo Real. Para tanto foram utilizadas as sequências de oligonucleotídeos depositadas no Banco de Primers (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>). Primeiramente, a eficiência e a especificidade dos oligonucleotídeos foram avaliadas. Neste ensaio, oligonucleotídeos específicos para TCTP, GAPDH, β -actina e PCNA, foram utilizados para amplificação de seus respectivos fragmentos em ambas as linhagens celulares B16-F1 e B16-F10 (FIGURA 9).

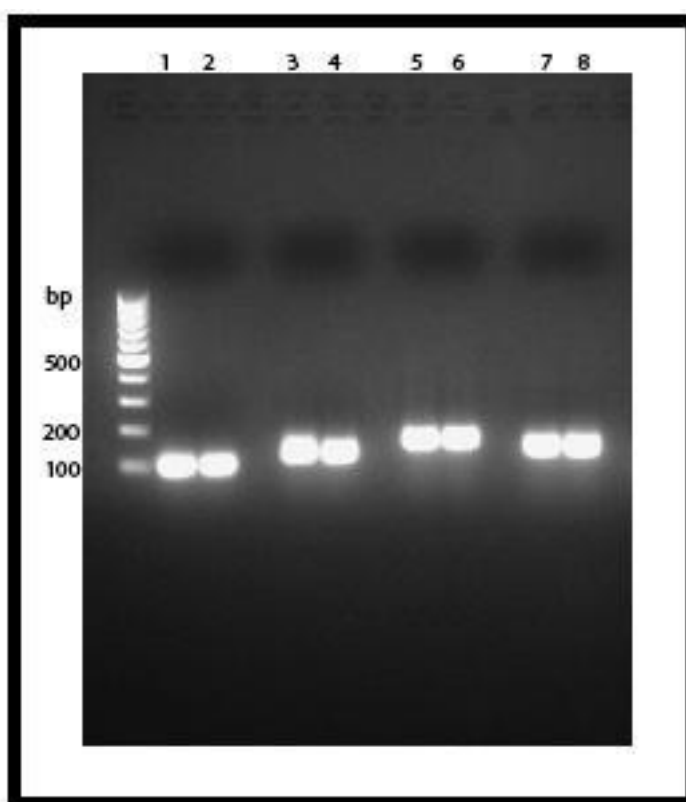


FIGURA 9: Avaliação dos primers para qPCR em Tempo Real em PCR convencional. PCR do cDNA amplificado a partir do RNAm extraído das linhagens celulares B16-F10 e B16-F1, referente as proteínas TCTP, GAPDH, β -actina e PCNA respectivamente. Colunas 1 e 2 apresentam a amplificação do cDNA referente ao RNAm TCTP, sendo em 1 extraído de B16-F1 e em 2 de B16-F10. Colunas 3 e 4 apresentam a amplificação do cDNA referente ao RNAm GAPDH, sendo em 3 extraído de B16-F1 e em 4 de B16-F10. Colunas 5 e 6 apresentam a amplificação do cDNA referente ao RNAm β -actina, sendo em 5 extraído de B16-F1 e em 6 de B16-F10. Colunas 7 e 8 apresentam a amplificação do DNA referente ao RNAm PCNA, sendo em 7 extraído de B16-F1 e em 8 de B16-F10. Gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídeo. Marcador de pares de base à esquerda.

Neste ensaio, pode-se verificar a amplificação para cada inserto no tamanho esperado. Além disso, há apenas uma banda como resultado de cada reação. A grande intensidade nas bandas dos produtos da reação de PCR sugere alta eficiência dos oligonucleotídeos. Estes resultados indicam que os oligonucleotídeos são específicos para cada reação.

Após os testes de especificidade dos primers, foram realizadas otimizações para os ensaios de PCR em Tempo Real. Para esse ensaio optou-se pela utilização do kit Power SYBR Green RNA-to- C_t 1-Step Kit, o qual permite a quantificação do RNAm em apenas um passo, não sendo necessária a produção prévia de DNA complementar. Para tanto, o RT-PCR e PCR em tempo real são realizados na mesma reação de PCR, sendo o RNA utilizado como molde dessa reação. A padronização inicial foi relativa às concentrações dos oligonucleotídeos (200 nM, 400 nM e 600 nM) utilizando RNA de ambas linhagens celulares. Após os testes, a concentração de 400 nM foi a escolhida por apresentar uma amplificação mais específica e eficiente (dados não mostrados). O próximo passo foi testar as concentrações do RNA a fim de obter uma melhor representação dos resultados com a utilização da menor quantidade de RNA possível. Foram testadas as concentrações 1, 5, 10, 20 e 40 pg de RNA. A concentração que apresentou a melhor amplificação quando comparada à quantidade de RNA empregado foi 10 pg (dados não mostrados).

Então, a fim de quantificar os RNAm referentes à TCTP em ambas as linhagens celulares foi realizado um PCR em Tempo Real utilizando as concentrações de oligonucleotídeos e RNA padronizadas. Para quantificação, o método de escolha foi por comparação do C_t (cycle threshold). O método comparativo C_t ($\Delta\Delta C_t$) é usado para determinar a quantidade relativa do alvo nas amostras. Para tanto, é medida a amplificação do alvo, controle endógeno e amostra referência. Os resultados são normalizados utilizando o controle endógeno. Dessa forma é possível determinar a quantidade relativa do alvo em cada amostra. A figura 10 representa o gráfico referente à expressão do gene *tpt1* nas linhagens B16-F1 e B16-F10. Pode-se observar uma diferença de expressão desse gene entre as duas linhagens, sendo que a B16-F10 apresenta uma maior quantidade de RNAm codificantes para TCTP. Esse resultado, em conjunto com os *western blottings* (FIGURAS 5 e 6) e com os

PCRs (FIGURA 8), mostram que existe uma maior quantidade de RNAm e da proteína TCTP na linhagem B16-F10.

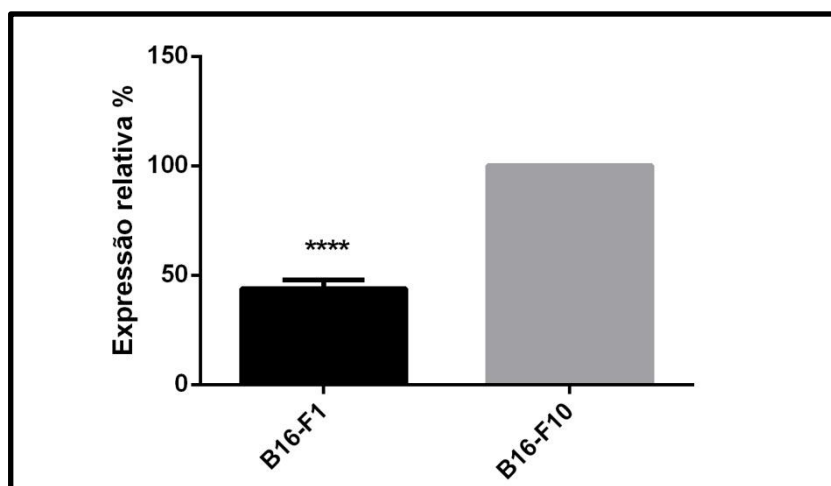


FIGURA 10: Porcentagem da expressão relativa de TCTP. Análise por PCR em Tempo Real dos níveis de TCTP nas linhagens B16-F1 e B16-F10. Para quantificação foi empregado o método $\Delta\Delta C_t$, utilizando GAPDH como padrão endógeno para cada amostra. Para os gráficos, $\Delta\Delta C_t$ foi normalizado para os controles. Os dados obtidos foram analisados utilizando teste T (n=5), foram realizados três experimentos independentes (**p<0,001).

Para confirmação do papel da TCTP na malignidade tumoral foi realizado estudo utilizando a técnica de RNA de interferência. Para tanto, primeiramente foi realizada a avaliação do potencial de transfecção das células B16-F10 utilizando diferentes quantidades de agente transfectante, nesse caso a lipofectamina, e diferentes concentrações de duplex (FIGURA 11). Pode-se observar que houve transfecção em todos os tempos, com todas as quantidades de lipofectamina e em ambas as concentrações de duplex. Entretanto, quando foi transfectado 50 nM de duplex com 3 μ L de lipofectamina pode-se observar uma maior intensidade de fluorescência em um maior número de células em todos os tempos testados. O mesmo aconteceu quando transfectadas as células com 100 nM do duplex. Embora 2 e 4 μ L de lipofectamina também demonstrassem uma boa transfecção essa não se manteve após 48 horas e diminuiu ainda mais em 72 horas. Sendo dessa forma 3 μ L de lipofectamina a quantidade escolhida para posteriores ensaios. Contudo, devido a pequena diferença de transfecção entre 50 nM e 100 nM, optou-se por fazer as duas concentrações e dessa forma avaliar se uma maior concentração de duplex poderia causar um maior silenciamento, ou uma resposta celular mais significativa.

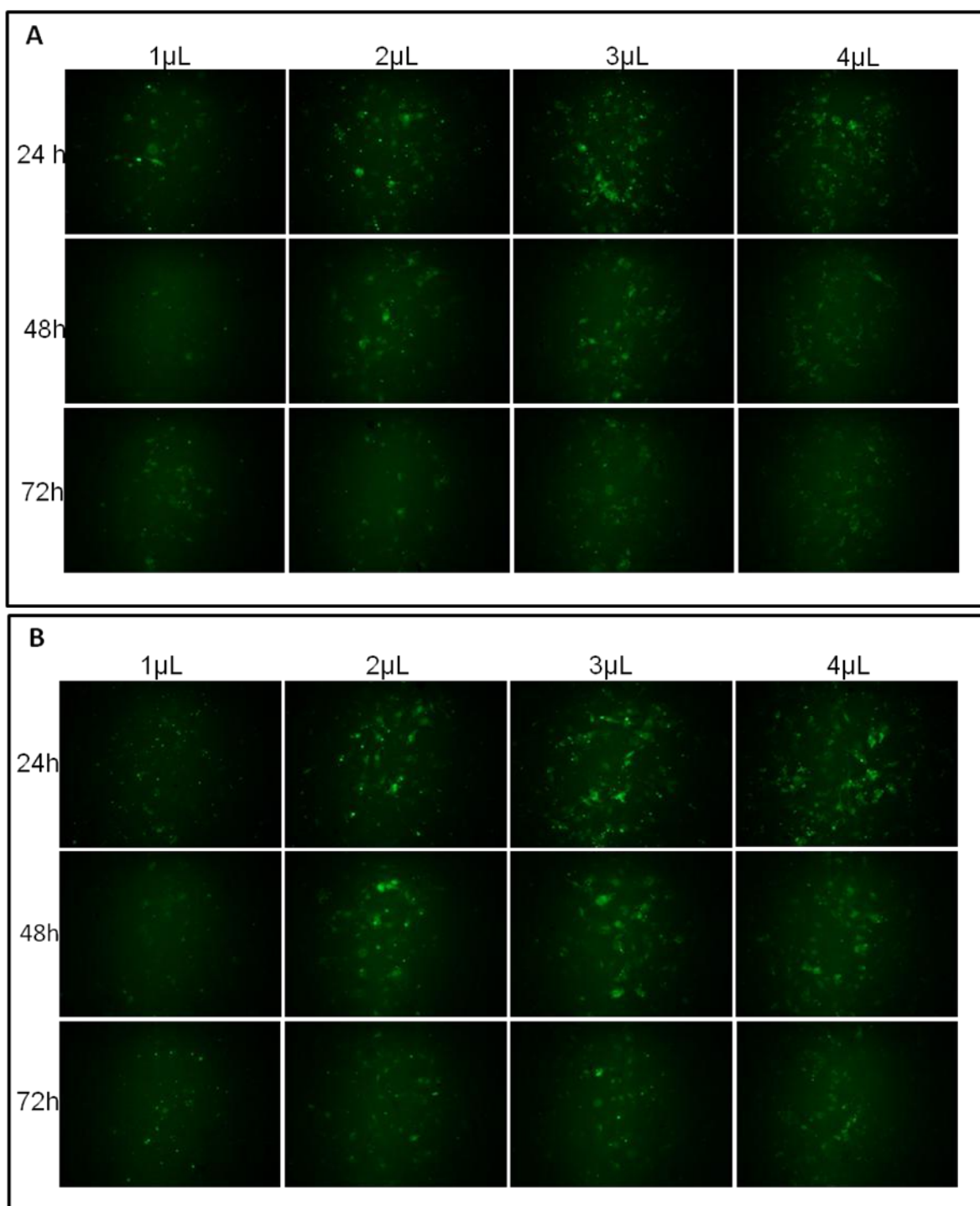


FIGURA 11: Avaliação do Potencial de Transfecção da linhagem B16-F10. Células da linhagem B16-F10 (105 células/poço) foram transfectadas utilizando o kit Block-iT Transfection (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) com 1,2,3,4 µL de Lipofectamina (Invitrogen, USA). Em A foi utilizado 50 nM do duplex fluorescente e em B 100 nM do duplex fluorescente. Após 24, 48 e 72 horas as células foram fotografadas em microscópio invertido de fluorescência Olympus IX71 e as imagens analisadas com auxílio do programa Olympus DP2-BSW.

Após os testes de transfecção passou-se para realização do RNA de interferência propriamente dito. Para tanto, foram plaqueadas células da linhagem B16-F1 e B16-F10 para os seguintes ensaios: PCR em tempo real, western blotting, proliferação, adesão, viabilidade e migração. Todos os ensaios foram realizados simultaneamente, após 24, 48 e 72 horas da transfecção e as células foram avaliadas segundo os critérios e procedimentos de cada teste.

O PCR em tempo real foi realizado utilizando os mesmos critérios de padronização adotados para as linhagens não transfectadas. Foram transfectados 50 nM (FIGURA 12) e 100 nM (FIGURA 13) de duplex de RNAi para TCTP e controle negativo na linhagem B16-F10. Após a transfecção foi extraído RNA total das células silenciadas e controle pelo método de TRIzol® (CHOMCZYNSKI, 1993). O gel da extração do RNA apresentou duas bandas bem definidas referentes aos RNAs ribossômicos 18S e 28S (PROMEGA RNA Analysis Notebook) (dado não mostrado). O RNA total foi dosado e a razão da sua concentração em relação à concentração proteica foi superior a 1.8, considerada ideal segundo Sambrook e Russel (2001).

A partir do RNA foi realizado o ensaio de PCR em tempo real. O processo de Knockdown foi eficiente em todos os períodos analisados, ou seja, foi encontrada redução do RNAm referente ao gene *tpt1* na linhagem celular de melanoma murino B16-F10 nas duas concentrações de duplex utilizadas (FIGURA 12 E 13). Analisando a figura 12 podemos observar que, 24 horas após a transfecção, a linhagem transfectada com RNAi para TCTP apresentava metade dos níveis de RNAm para *tpt1* que linhagem transfectada com o controle negativo. Nos tempos de 48 e 72 horas após a transfecção a interferência se manteve e os níveis de TCTP decaíram para aproximadamente 40% e 30% se comparada a linhagem transfectada com o controle negativo. Analisando os dados obtidos com a transfecção de 100 nM de RNAi para TCTP (FIGURA 13) podemos notar que após 24 horas de transfecção os níveis intracelulares de RNAm para TCTP diminuíram para 40% se comparado ao controle negativo. Além disso, essa redução mostrou-se eficiente até 3 dias (72 horas) após a transfecção, apresentando ainda níveis inferiores daqueles encontrados quando utilizado 50 nM de RNAi para TCTP (30% e 20%, respectivamente).

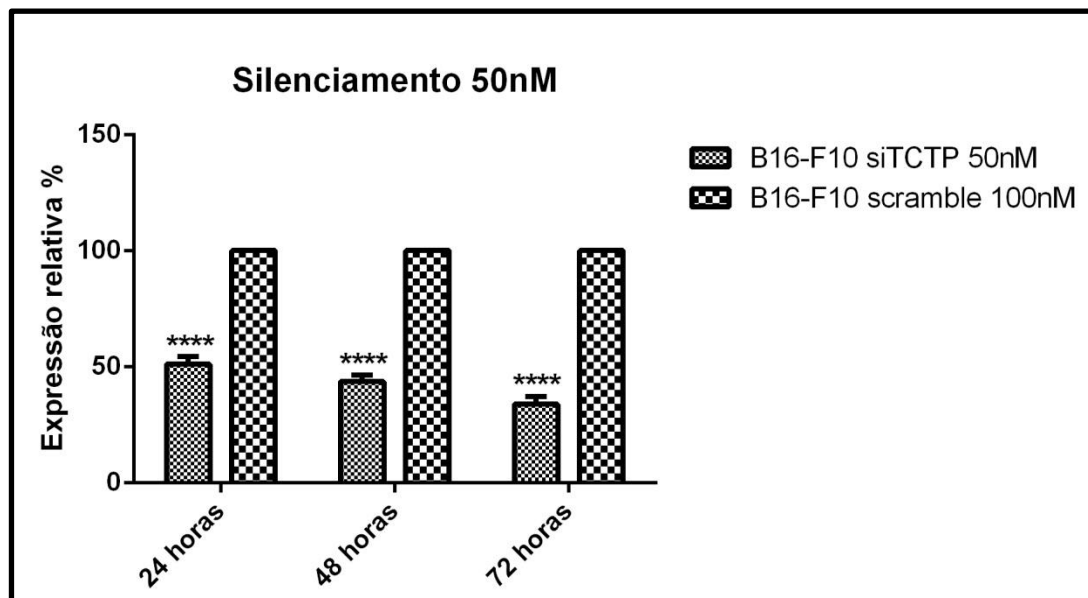


FIGURA 12: Porcentagem da expressão relativa de TCTP após transfecção com 50 nM de siRNA para TCTP e controle negativo. Análise por PCR em Tempo Real dos níveis de TCTP na linhagem B16-F10 em 24, 48 e 72 horas após a transfecção. Para quantificação foi empregado o método $\Delta\Delta C_t$, utilizando GAPDH como padrão endógeno para cada amostra. Para os gráficos, $\Delta\Delta C_t$ foi normalizado para os controles. Os dados obtidos foram analisados utilizando teste t (n=5), foram realizados três experimentos independentes (***p<0,001).

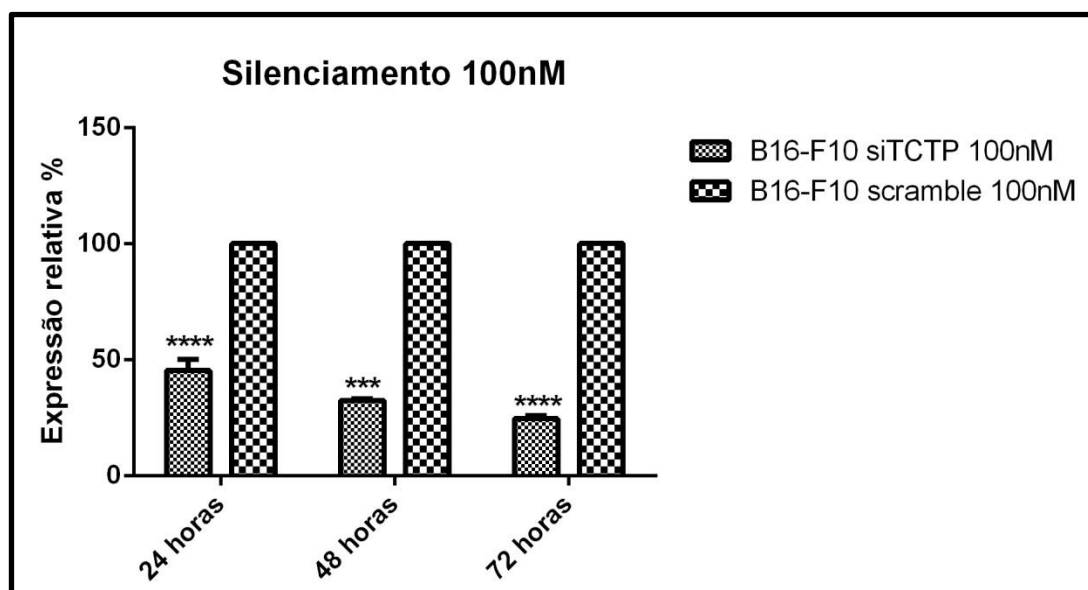


FIGURA 13: Porcentagem da expressão relativa de TCTP após transfecção de 100 nM de siRNA para TCTP e controle negativo. Análise por PCR em Tempo Real dos níveis de TCTP na linhagem B16-F10 em 24, 48 e 72 horas após a transfecção. Para quantificação foi empregado o método $\Delta\Delta C_t$, utilizando GAPDH como padrão endógeno para cada amostra. Para os gráficos, $\Delta\Delta C_t$ foi normalizado para os controles. Os dados obtidos foram analisados utilizando teste t (n=5), foram realizados três experimentos independentes (***p<0,001).

Uma vez que o silenciamento foi efetivo, foram realizados ensaios avaliando os perfis celulares das linhagens silenciadas e não silenciadas. O ensaio de proliferação celular foi realizado utilizando o corante cristal violeta. A figura 14 mostra a proliferação das células não transfectadas e transfectadas com RNAi e controle negativo em 24 e 72 horas. Analisando os resultados, as células transfectadas com 50 nM e 100 nM de RNAi apresentaram redução significativa na proliferação em 24 e 72 horas se comparado ao controle negativo. Também se pode observar, como esperado, que a linhagem B16-F1 apresentou menor potencial proliferativo que a linhagem B16-F10.

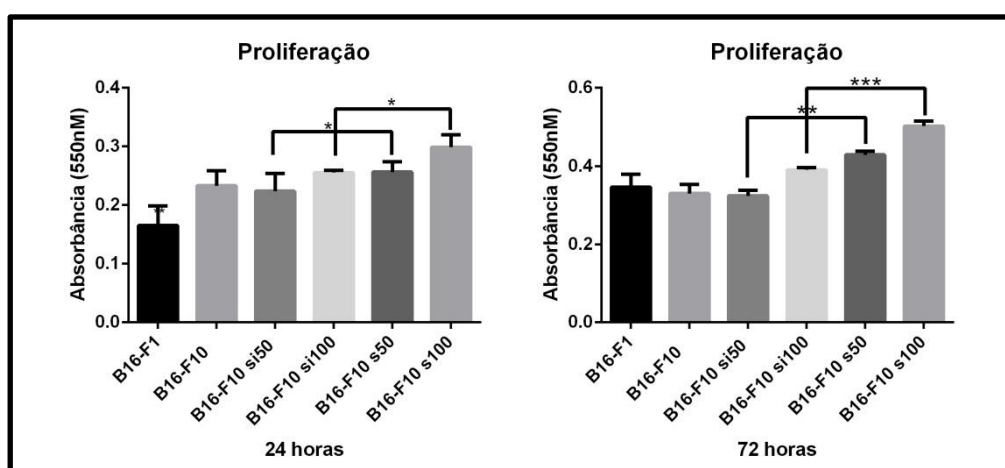


FIGURA 14: Avaliação da Proliferação Celular com Cristal Violeta. Células das linhagens B16-F1 e B16-F10 e B16-F10 transfectadas utilizando RNAi para TCTP (B16-F10si50 e B16-F10si100) e o controle negativo scramble (B16-F10s50 e B16-F10s100) (10^4 células/poço). 24 e 72 horas após a transfecção as células foram fixadas e coradas, a absorbância foi medida em 550nm. Os dados obtidos foram analisados comparando a linhagens transfectadas com RNAi para TCTP e com o controle negativo utilizando One-way ANOVA utilizando pós teste de Tukey ($n=5$), foram realizados dois experimentos independentes (* $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$).

Após foi avaliada a viabilidade celular pela medida da atividade metabólica pelo método do MTT. A figura 15 mostra que não houve diminuição significativa na viabilidade celular quando as células foram transfectadas com RNAi após 24, 48 e 72 horas da transfecção.

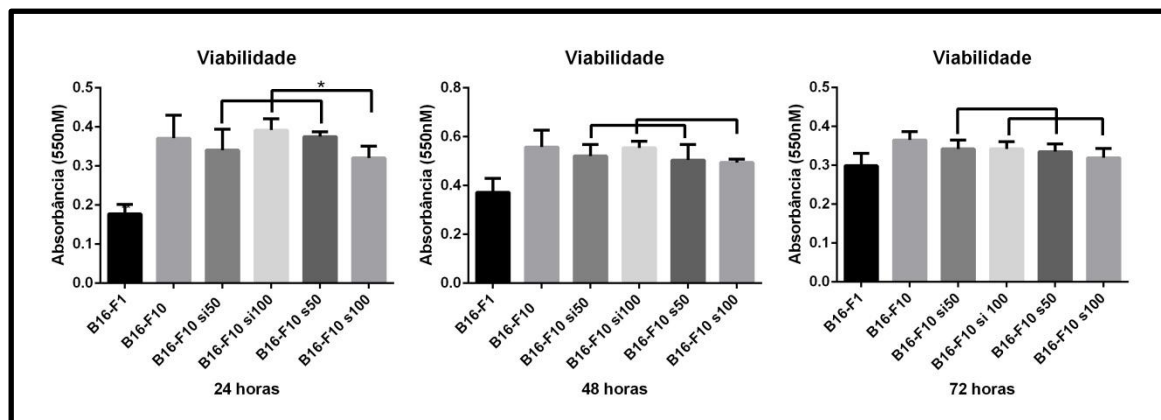


FIGURA 15: Viabilidade Celular após interferência por RNA. Células das linhagens B16-F1 e B16-F10 e B16-F10 transfetadas utilizando RNAi para TCTP (B16-F10si50 e B16-F10si100) e o controle negativo scramble (B16-F10s50 e B16-F10s100) (10^4 células/poço). 24, 48 e 72 horas após a transfecção as células foram fixadas e coradas, a absorbância foi medida em 550nm. Os dados obtidos foram analisados utilizando One-way ANOVA utilizando pós teste de Tukey (n=5), foram realizados dois experimentos independentes (*p<0,05).

A fim de avaliar o potencial migratório das linhagens, foram escolhidas duas metodologias: método de *scratch* e ensaio de *transwel*. Primeiro em dois experimentos independentes foi avaliada migração pelo método do *scratch*. Após 4 horas de transfecção as placas foram riscadas e a distancia entre as margens dos riscos foi medida em 0, 6, 24 e 48 e 72 horas. O experimento foi realizado na ausência de soro fetal bovino a fim de evitar a proliferação celular. Na figura 16 são apresentados os resultados dos tempos 0, 6 e 24 horas visto que após esse período as células já haviam praticamente fechado todo o espaço do risco dificultando e impossibilitando a medida. Na figura 16 pode-se observar que a linhagem B16-F1 migrou menos que a linhagem B16-F10. Sendo que 24 horas após a transfecção a linhagem B16-F10 chegou a migrar dez vezes mais que a B16-F1. Na figura 16 ainda temos as medidas de migração e imagem das linhagens transfetadas com RNAi para TCTP e controle negativo. Podemos observar que a linhagem transfetada com o controle negativo migrou muito menos que a linhagem transfetada com RNAi para TCTP. Quando utilizado 100 nM ocorreu uma maior migração no controle negativo e uma menor migração quando utilizado RNAi para TCTP do que quando utilizado 50 nM. Além disso, as linhagens silenciadas migraram cerca de dez vezes menos que as linhagens controle. Comparando os resultados obtidos na figura 16 pode-se

notar uma semelhança no perfil migratório das linhagens transfectadas com o controle negativo e a linhagem B16-F10 não transfectada. Além disso, a diminuição da migração observada quando utilizado o RNAi para TCTP é semelhante a migração observada pela linhagem B16-F1 (FIGURA 16).

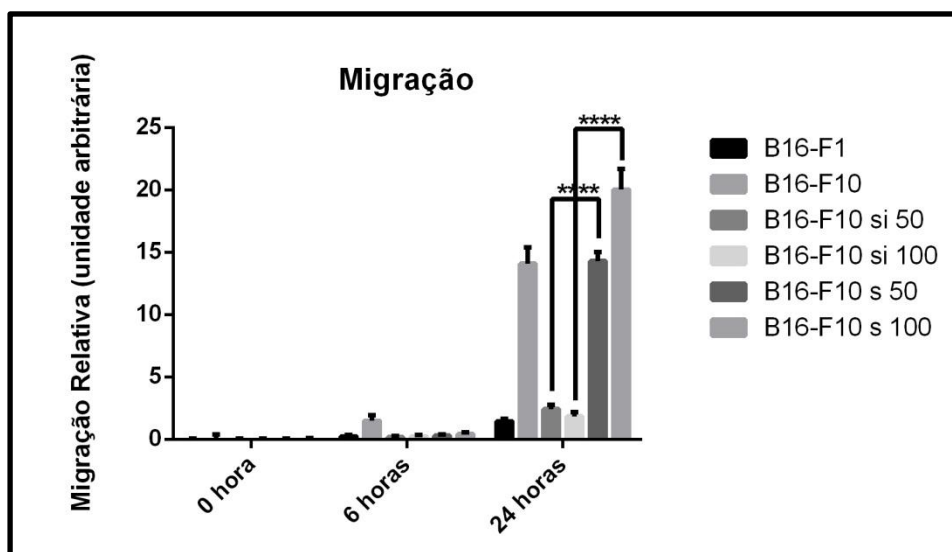


FIGURA 16: Comparação do perfil de migração da linhagem B16-F1 e B16-F10 e as linhagens silenciadas. Foram plaqueadas 10^5 células em placas de 24 poços e transfectadas com lipofectamina e 50 e 100nM de RNAi para TCTP ou o controle negativo. Após 4 horas de transfecção foi feito um risco (*scratch*) na placa (tempo 0). Após 6, 24 e 48 horas as células foram fotografadas e a distancia de migração foi medida. As imagens são referentes a medida no tempo 24 horas. Foram realizados dois experimentos independentes (n=1).

Após o ensaio de migração por *scratch*, verificou-se que com 50 nM de duplex já era possível visualizar alteração no perfil migratório. Essa concentração foi então escolhida para realização do ensaio em câmara de transwell (FIGURA 17). Em todos os tempos pode-se observar uma diminuição do perfil migratório da linhagem silenciada se comparada à linhagem não transfectada e a linhagem transfectada com o controle negativo. Também se pode observar que a linhagem cuja TCTP aparece silenciada, apresenta um potencial migratório inferior a linhagem B16-F1.

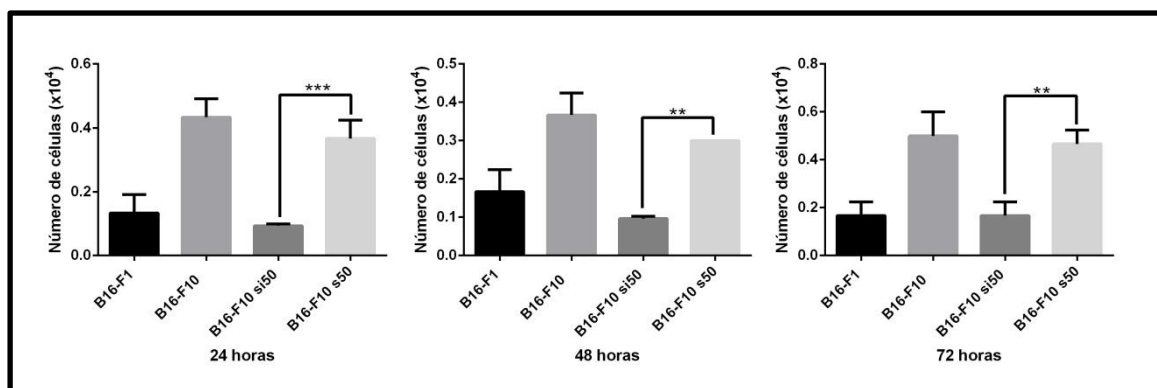


FIGURA 17: Efeito do RNAi para TCTP na migração celular por transwell. O potencial migratório das células da linhagem B16 foi determinado em ensaio utilizando as câmaras de cultura Transwell 8µM (Corner). Foram plaqueadas 5×10^4 células com meio sem soro e o soro fetal bovino foi utilizado como quimioatraente. Após incubação as células foram contadas em hemocítmetro. Os dados obtidos foram analisados utilizando One-way ANOVA utilizando pós teste de Tukey ($n=3$), experimento único (* $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$).

Foi realizado também o ensaio de adesão utilizando, como substratos na placa, diferentes moléculas de Matriz Extracelular. Foram testadas as moléculas: Matrigel, Colágeno I, Laminina, Fibronectina e Vitronectina. Em todos os tempos pode-se observar que as linhagens transfectadas apresentaram uma maior adesão a todas as moléculas de matriz em relação ao controle negativo, mesmo que em alguns tempos essa adesão não tenha sido estatisticamente significativa (FIGURA 18). Em 24 horas após a transfecção pode-se observar que somente a linhagem transfectada com 100 nM de RNAi para TCTP apresentou uma adesão significativa, sendo essa a molécula vitronectina e a de 50 nM apresentou adesão significativa a colágeno do tipo I. Após 48 horas de transfecção as células transfectadas com 50 nM de siRNA apresentaram uma maior adesão ao matrigel, fibronectina e vitronectina, enquanto a célula transfectada com 100 nM de RNAi para TCTP apresentou

uma maior adesão somente a laminina. A célula da linhagem B16-F1 aderiu relativamente mais que as outras células a todas as moléculas de matriz testadas, como era o esperado. Já em 72 horas, as células transfectadas com 50 nM de RNAi para TCTP apresentaram uma adesão significativa ao colágeno do tipo I, enquanto as transfectadas com 100 nM apresentaram adesão significativa ao colágeno do tipo I e ao matrigel.

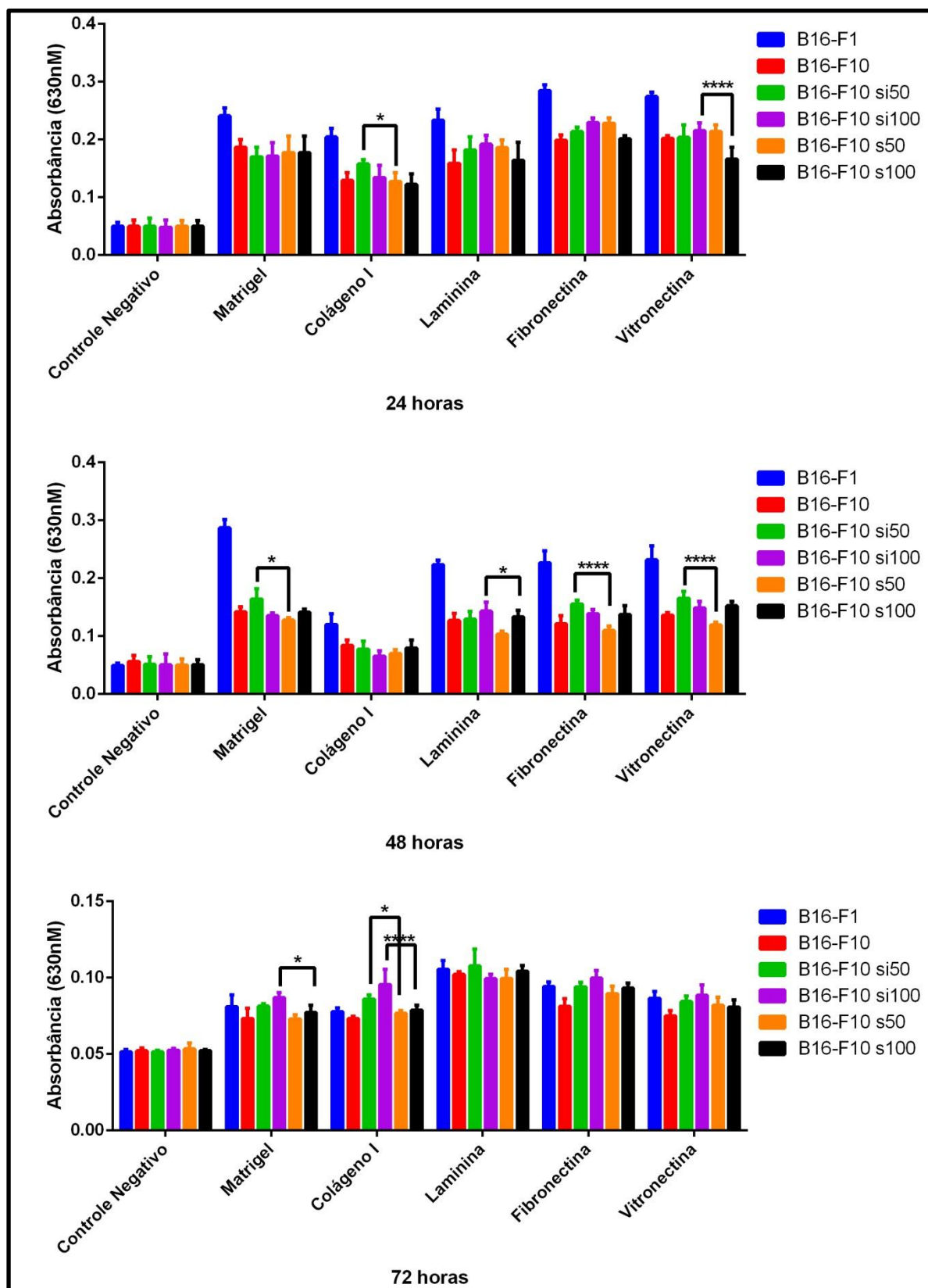


FIGURA 18: Adesão das células não transfectadas e transfectadas com RNAi para TCTP e controle negativo. As células foram plaqueadas em poços pré-tratados com proteínas de matriz (laminina, colágeno I, fibronectina, vitronectina e matrigel) e BSA. Em seguida foi realizada a fixação e a coloração para quantificação colorimétrica. Os dados obtidos foram analisados utilizando One-way ANOVA utilizando pós teste de Tukey (n=5), foram realizados dois experimentos independentes (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001).

5. DISCUSSÃO

Culp e colaboradores (2006) ao realizar o proteoma do tumor sólido de B16-F10, utilizou 200 µg de proteína originada de um tumor sólido de B16-F10 presente em camundongos C57BL/6. Nessas condições seu estudo identificou diferentes quantidades de proteínas de acordo com o tempo de crescimento tumoral (3 dias- 869 *spots*, 5 dias- 1210 *spots*, 7 dias- 1424 *spots* e 10 dias- 1538 *spots*), sendo essas superiores aos 201 *spots* encontrados nesse trabalho. É descrito que tumores sólidos em crescimento apresentam um microambiente constituído não apenas de células tumorais, mas por células não tumorais, componentes da matriz extracelular e moléculas solúveis (VAN KEMPEN, *et al*, 2003). Entretanto, o nível de complexidade das amostras analisadas por Culp e colaboradores (2006) foi superior devido a diferentes tipos celulares estarem presentes na massa tumoral resultando em um aumento do número de proteínas caracterizadas. Além disso, em sua análise foram utilizadas células do tumor e dos fluidos circulantes, como por exemplo, o sangue. Em seu estudo, Culp e colaboradores (2006) identificaram uma proteína com mobilidade eletroforética aparente de 19 kDa e PI 4,8, a qual foi identificada por espectrometria de massas como TCTP. Em nossas análises encontramos uma proteína com mobilidade eletroforética aparente de 20 kDa e pl 4,8 nas duas linhagens celulares e sugerindo a presença de TCTP devido a semelhante mobilidade eletroforética e ponto isoelétrico, os quais são esperados para essa proteína.

Analisando a diferença no número de *spots* presentes nos dois extratos celulares (FIGURA 4) podemos notar que a linhagem B16-F10 apresenta um maior número de *spots* (201 *spots*) se comparado a B16-F1 (126 *spots*). Sabe-se que alterações na expressão de proteínas estão relacionadas ao desenvolvimento tumoral, metástase e invasão, dessa forma o maior número de *spots* pode evidenciar a complexidade de mecanismos de sinalização, regulação gênica e interações moleculares que ocorrem durante a tumorigênese e metastização (MCKENZIE; GROSSMAN, 2012; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O anticorpo policlonal que foi utilizado no presente trabalho foi produzido utilizando como antígeno uma TCTP recombinante obtida da glândula de veneno de *Loxosceles intermedia*, que possui 28 kDa. Quando utilizado sobre o veneno este anticorpo reconhece apenas a banda na altura de 28 kDa que corresponde à LiTCTP. (SADE *et al.*, 2012). Quando utilizado sobre os extratos celulares de B16-F1 e B16-F10 (FIGURA 5 e 6) houve reconhecimento de uma *spot* bastante específico, com mobilidade aparente de 19 kDa e pI 4,8, os quais são esperados para TCTP, dessa forma prosseguimos com a investigação do conteúdo de TCTP nas duas linhagens de melanoma murinho com esse soro policlonal. Além disso, optou-se por utilizar esse anticorpo como ferramenta devido ao fato da TCTP ser uma proteína altamente conservada entre os eucariotos (VENUGOPAL, 2005; HINOJOSA-MOYA *et al.*, 2008; BOOMER, 2012). Porém, mesmo os resultados indicando a identificação de TCTP nas linhagens B16F10 e B16F1, ainda são necessários ensaios posteriores de espectrometria de massas para confirmar a identidade da TCTP.

Analizando a diferença de intensidade de sinal da reação imunológica encontrada nos extratos de B16-F1 e B16-F10 podemos sugerir que a linhagem B16F10 apresenta níveis intracelulares de TCTP mais elevados. Sabendo que a B16-F1 apresenta baixo potencial metastático e a B16-F10 alto potencial metastático, apesar de ambas serem linhagens de melanoma murino, sugeriu-se que essa diferença esteja relacionada à agressividade e malignidade das linhagens. A proteína TCTP tem sido associada com tumores agressivos e metastáticos sendo um fator de prognóstico negativo (KIM *et al.*, 2008; NIFOROU *et al.*, 2008; ZHU *et al.*, 2008; SLABY *et al.*, 2009). Portanto, uma diferença na transcrição da proteína TCTP nos diferentes tipos celulares poderia acarretar uma variação do potencial de metástase (FIDLER, 1973; FIDLER, 1975; NICOLSON *et al.*, 1978; TANIGUCHI *et al.*, 1985; NAKAMURA *et al.*, 2002).

Ao utilizar os oligonucleotídeos específicos para TCTP e GAPDH (FIGURA 8) pode-se observar que a banda referente à B16-F10, assim como observado no imunoensaio (FIGURAS 5 e 6), apresenta maior intensidade que pode ser relacionada a uma maior quantidade de RNAm para TCTP nesta linhagem celular. Esse fato corrobora com a literatura visto que uma maior

expressão de TCTP está relacionada à malignidade tumoral. A linhagem B16-F10, já descrita como mais metastática e invasiva que a B16-F1 (FIDLER, 1973; FIDLER, 1975; NICOLSON *et al.*, 1978; TANIGUCHI *et al.*, 1985; NAKAMURA *et al.*, 2002), apresentou níveis superiores de TCTP. Dessa forma, os resultados apresentados até o momento indicam que os níveis intracelulares de proteína TCTP, bem como a sua taxa de transcrição podem estar envolvidos na diferença de malignidade observada entre estas linhagens celulares.

Entretanto, diferentemente do resultado encontrado na figura 8 as amplificações das sequências referentes à TCTP de B16-F1 e B16-F10 não apresentaram diferenças na intensidade das bandas quando o RT-PCR foi realizado (FIGURA 9). Esse resultado foi inicialmente bastante intrigante, visto que os resultados anteriores mostraram que as linhagens teriam conteúdo proteico e de RNA mensageiro de TCTP diferentes. Contudo, nas reações de PCR as amplificações ocorrem de maneira exponencial e ao final da ciclagem alcançam um platô. Esse fato provavelmente impediu a observação da diferença de expressão entre as linhagens (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). No PCR anterior (semi-quantitativo), cujo resultado foi apresentado na figura 8, a diferença de expressão foi melhor evidenciada quando reduzimos o número de ciclos afastando a possibilidade de atingir o platô. O objetivo inicial dessa reação de PCR era verificar a eficiência e especificidade dos oligonucleotídeos, portanto, esta reação não foi repetida buscando as condições ideais para observação de diferenças nos níveis de transcrição do RNA mensageiro da proteína TCTP entre as duas linhagens de melanoma murino.

A fim de quantificar o RNAm referente a TCTP nas linhagens celulares B16-F1 e B16-F10 foi realizado ensaio de PCR em tempo real (FIGURA 10). Com isso foi possível evidenciar uma maior quantidade RNAm para TCTP na linhagem B16-F10 do que na linhagem B16-F1. Esses resultados corroboram com dados da literatura que relatam que a TCTP está relacionada à malignidade e ao mau prognóstico tumoral. Estudos anteriores demonstraram que a TCTP apresenta sua expressão aumentada em diferentes tipos de tumores, como câncer de cólon (CHUNG *et al.*, 2000), câncer de próstata (ARCURI *et al.*, 2004) e hepatocarcinoma (CHAN *et al.*, 2012). Além disso, estudos em hepatocarcinoma relacionaram a TCTP ao mal prognóstico (CHAN *et al.*, 2012a) e também a metástases, sendo essa proteína identificada em metástases de pacientes com hepatocarcinoma (CHAN *et al.*, 2012b).

Em melanoma, dados de estudo de proteômica identificaram a TCTP como proteína relacionada à resistência ao tratamento por quimioterapia (cisplatina, vindesina, etoposide e fotemustina). Neste estudo foram comparadas linhagens de células MeWo (melanoma humano) a suas contrapartidas resistentes à quimioterapia, as células quimioresistentes apresentavam índices aumentados de TCTP (SINHA *et al.*, 2000).

Da mesma forma, assim como encontrado nesse trabalho (FIGURA 14, 15, 16, 17 e 18), as células da linhagem B16-F10 apresentam um potencial mais metastático e um perfil mais agressivo se comparado à B16-F1 (FIDLER, 1973; FIDLER, 1975; NICOLSON *et al.*, 1978; TANIGUCHI *et al.*, 1985; NAKAMURA *et al.*, 2002). Os resultados obtidos sugerem que uma maior expressão da TCTP está relacionada à malignidade tumoral encontrada na linhagem B16-F10.

A proteína TCTP está relacionada com o crescimento, proliferação celular, progressão do ciclo celular, apoptose e regulação da pluripotência (CHAN *et al.*, 2012b; AMSON *et al.*, 2012; BOMMER *et al.*, 2012). Além disso, estudos anteriores relacionaram os níveis de TCTP ao processo de reversão tumoral. Este processo está baseado num raro evento espontâneo e fisiológico no qual as células tumorais perdem seu fenótipo maligno, passando a um fenótipo mais próximo do normal. Os genes envolvidos nesse processo foram identificados, dentre os quais o gene da TCTP mostrou ser o mais importante. Além disso, a inibição da expressão de TCTP por técnicas de RNA de interferência resultou na supressão do fenótipo maligno (Telerman e Amson, 2009). Estudos demonstraram que o silenciamento do gene da proteína TCTP por siRNA em células de câncer de próstata reduz o crescimento celular e induz à apoptose (GNANASEKAR *et al.*, 2009). Mostrando que uma diminuição dos níveis de TCTP está relacionado a um fenótipo celular mais próximo do normal.

A fim de melhor compreender o papel da TCTP na malignidade tumoral foi utilizada a técnica de RNA de interferência (RNAi) na qual, através do silenciamento gênico é possível avaliar a função de um gene (GOTTUMUKKALA, *et al.*, 2013).

Dessa forma a diminuição da expressão de TCTP utilizando siRNA pode ser de grande interesse a fim de entender o papel da TCTP na malignidade celular em melanoma a fim de melhor compreender os mecanismos pelos quais essa proteína multifuncional atua no câncer. Para tanto foram testadas diferentes concentrações de agente transfectante, no

caso lipofectamina e de duplex para um silenciamento mais eficaz.

Existem diversos métodos de introdução dos duplex de RNA como a microinjeção (FIRE *et al.*, 1998), alimentação (XIANG *et al.*, 2006), mergulho (LILLEY *et al.*, 1999), transfecção (ELBASHIR *et al.*, 2001), microarray (MOUSSES *et al.*, 2003), absorção a partir de meio sólido (CLEMENS *et al.*, 2000), inoculação mecânica (TENLLADO *et al.*, 2003), transgenia (KUNATH *et al.*, 2003), injeção caudal (MACCAFFREY *et al.*, 2003), eletroporação (PEKARIK *et al.*, 2003), entre outros. Para tanto, a estratégia experimental deve levar em consideração o tipo de molécula tendo em vista a duração do silenciamento e o método de introdução (local ou sistêmico). O método de entrega escolhido foi a transfecção, pois já é descrita sua eficiência e eficácia em células B16-F10 (CARVALHO *et al.*, 2008; VALLES *et al.*, 2013) bem como sua utilização no delivery de duplex para silenciamento da TCTP (WU *ET AL.*, 2011; CHU *ET AL.*, 2011).

Assim como em trabalhos encontrados na literatura, a diminuição na expressão de TCTP utilizando duplex de siRNA foi significativa em ambas as concentrações testadas. Chu e colaboradores (2011), utilizando 100 nM de lipofectamina como agente transfectante obteve aproximadamente 80% de silenciamento do gene *tpt1* referente a proteína TCTP em células de câncer de colon humano. Da mesma forma, Wu e colaboradores (2011) utilizaram 100 nM de siRNA para TCTP em seus ensaios e obtiveram silenciamento significativo em 24, 48 e 71 horas. Corroborando com esses dados da literatura, nossos experimentos demonstraram que o duplex desenhado foi capaz de diminuir em até 80% os níveis de expressão do gene *tpt1*.

Com a diminuição da quantidade de RNAm para TCTP confirmada, foram realizados os ensaios de proliferação celular, viabilidade, migração e adesão celular. Nesses ensaios podemos notar uma diminuição da proliferação nos tempos testados, da mesma forma as células silenciadas migraram menos e tornaram-se mais aderentes a proteínas de matriz extracelular.

A diminuição na proliferação indica que a linhagem silenciada apresenta um perfil celular menos proliferativo que a linhagem controle. Além disso, um menor potencial migratório foi observado, sendo esse inferior ao o potencial migratório da linhagem B16-F1. Aumento da proliferação celular, assim como o potencial migratório são dois eventos muito importantes para o desenvolvimento de tumores e estão intimamente relacionados à malignidade tumoral. Dessa forma a avaliação desses perfis é extremamente importante quando se trata do estudo do câncer. Provavelmente a característica mais fundamental das células

cancerosas envolve sua capacidade de sustentar a proliferação crônica e sua resistência à apoptose (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011). A diminuição na proliferação, bem como, na migração podem estar relacionadas a um aumento da apoptose e a uma diminuição do potencial proliferativo e migratório dessas células, características que remetem à perda do fenótipo maligno. Os estudos realizados por Tuynder e colaboradores (2004) indicam que a diminuição dos níveis de TCTP em linhagens de melanoma humano (WM-266-4, WM-115, SK-MEL-28 e Hs852T) reverte o fenótipo maligno, e a inibição da expressão de TCTP leva a um fenótipo de reversão tumoral em células NIH3T3, portanto a redução dos níveis de TCTP relaciona-se fortemente à reversão. (TUYNDER *et al.*, 2004).

Carcinomas que progrediram a partir de tecidos epiteliais para graus mais elevados de malignidade tendo em vista a invasão local e metástases à distância apresentaram as células com alterações em sua forma, bem como na sua fixação a outras células e a matriz extracelular (BERX; VAN ROY, 2009; CAVALLARO; CHRISTOFORI, 2004). Além disso, a expressão de genes que codificam para outras moléculas de adesão célula- célula e célula- matriz extracelular são comprovadamente alterados em alguns carcinomas altamente agressivos (CAVALLARO; CHRISTOFORI, 2004). O processo de múltiplos passos de invasão e metástase tem sido esquematizado como uma sequência de passos discretos, muitas vezes chamado de cascata de invasão e metástase (TALMADGE; FIDLER, 2010; FIDLER, 2003). Esta representação vislumbra uma sucessão de células, mudanças biológicas, começando com a invasão local, em seguida, por migração das células cancerosas para vasos sanguíneos e linfáticos próximos, trânsito de células cancerosas através dos sistemas linfático e hematogênicos, seguido de fuga das células cancerosas do lúmen de tais locais para o parênquima dos tecidos distantes (extravasamento), a formação de pequenos nódulos de células cancerosas (micrometástases), e finalmente o crescimento de lesões para tumores macroscópicos, denominado "colonização" (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011).

Interações de células com a matriz extracelular (MEC) são fundamentais para muitos aspectos-chave no comportamento de células, incluindo adesão celular, crescimento, migração, diferenciação, morte celular programada e montagem da MEC. Por sua vez, estes processos celulares estão envolvidos no desenvolvimento embrionário e na formação de tecidos, cicatrização de feridas e reparação de tecidos, bem como no crescimento de tumores e metástases. Várias classes de receptores de adesão estão presentes em vários tipos celulares como integrinas, selectinas, moléculas de adesão celular

da superfamília das imunoglobulinas e proteoglicanos de heparan sulfato, que no conjunto definem padrões específicos de interação celular com glicoproteínas da matriz tais como a fibronectina, colágenos, lamininas bem como proteoglicanos da matriz (ZEMSKOV *et al.*, 2006).

Dessa forma para que a células invada novos tecidos ela precisa migrar e assim realizar diferentes interações célula-célula e célula-MEC. A adesão de células tumorais inclui a adesão entre as células tumorais assim como adesão a outros tipos celulares. A capacidade de adesão das células metastáticas é um fator crítico para invasão e formação de um novo foco de tumor (PAN *et al.*, 2005). Ao realizar o silenciamento da TCTP foi possível observar uma redução da migração, bem como uma maior adesão as moléculas de matriz testadas se comparada com o controle negativo. Isso indica que o silenciamento da TCTP gera células menos móveis, e consequentemente menos metastáticas e invasivas. Quanto maior a interação entre as células e a matriz, menor o potencial migratório e consequentemente a metástase do tumor. Assim as células transfectadas com siRNA para TCTP apresentaram um perfil mais próximo a normalidade do que a linhagem transfectada com o controle negativo sugerindo uma reversão do fenótipo maligno com a diminuição da expressão de TCTP.

Nesse estudo, o silenciamento reduziu significativamente a migração e aumentou a adesão das células às moléculas de matriz extracelular. A invasão de células tumorais em tecidos adjacentes, um acontecimento essencial para a metástase, envolve interações célula-célula e célula- matriz extracelular (ZHAO *et al.*, 2008). Uma diminuição na migração e aumento na adesão sugerem que essa células esteja fortemente ligada a MEC, reduzindo sua migração e consequentemente invasão a outros tecidos. Estudos anteriores utilizando células de adenocarcinoma de cólon demonstraram que a redução dos níveis de TCTP por RNA de interferência também foi capaz de reduzir a proliferação, migração e invasão dessas células *in vitro* e *in vivo*, mostrando que a TCTP era uma proteína importante na progressão do adenocarcinoma de cólon (Ma *et al.*, 2000). Os resultados aqui apresentados revelaram que a expressão diferencial da TCTP está associada à malignidade, e sugerem que a inibição da expressão da TCTP nas células cancerosas podem ser um mecanismo de redução do tumor.

Somente após a realização do western blott, mostrando que após a interferência, além de diminuição do RNAm houve queda da quantidade de proteína TCTP é possível responsabilizar o silenciamento pelas alterações no

fenótipo celular. São necessários mais estudos que auxiliarão no entendimento sobre a função da TCTP no melanoma murino. Esses estudos são fundamentais no sentido de que a dowregulation da TCTP tem sido utilizada em modelos biológicos de reversão tumoral (TUYNDER *et al.*, 2004; TUYNDER *et al.*, 2002).

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Através da eletroforese bidimensional foi possível verificar uma diferença na presença de proteínas entre os extratos de B16-F1 e B16-F10. Contudo ambos os géis apresentaram um *spot* com *pI* e mobilidade eletroforética esperados para TCTP. Com a utilização de anticorpos policlonais produzidos contra LiRecTCTP foi possível detectar um *spot* nos extratos referentes às linhagens B16-F1 e B16-F10. A imunodeteção revelou um *spot* com o mesmo *pI* e mobilidade eletroforética visualizados na eletroforese bidimensional. Além disso, obtivemos uma diferença de intensidade nas bandas entre as linhagens estudadas sugerindo uma diferente quantidade de proteína TCTP presente nos extratos das linhagens, sendo ela mais abundante no extrato da linhagem B16-F10 (mais metastática).

Utilizando técnicas de PCR e PCR em Tempo Real foi possível verificar uma diferença de expressão do gene *tpt1* referente a proteína TCTP, sendo que a linhagem mais maligna (B16-F10) apresentou uma maior expressão de TCTP corroborando com dados da literatura.

A utilização de RNA de interferência resultou numa queda de expressão da TCTP na linhagem B16-F10 o que foi responsável por alterações nos perfis celulares das linhagens interferidas. Essas apresentaram uma menor proliferação, menor migração e maior adesão a todas as moléculas de matriz testadas. Esses dados sugerem que o silenciamento da TCTP tornou a linhagem B16-F10 menos metastática e maligna, com um fenótipo mais próximo ao de uma célula normal.

Ainda será avaliado o potencial de invasão das células silenciadas *in vivo* a fim de melhor caracterizar o papel da TCTP na malignidade do melanoma murino. Estudo comparativos entre os perfis celulares quando utilizado o silenciamento e drogas como sertralina serão realizados, a fim de encontrar uma terapia mais eficaz. Além disso serão realizados ensaios a fim de identificar possíveis parceiros moleculares da TCTP no desenvolvimento e progressão do câncer..

REFERENCIAS

ADAM, Y.G.; EFRON, G. Cutaneous malignant melanoma: Current views on pathogenesis, diagnosis and surgical management. **Surgery**, v.93(4), p.481-490, 1983.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Biologia Molecular da Célula*. Quarta Edição. Porto Alegre: Artmed, 2004.

AMSON, R.; PECE, S.; LESPAGNOL, A.; VYAS, R.; MAZZAROL, G.; TOSONI, D.; COLALUCA, I.; VIALE, G.; RODRIGUES-FERREIRA, S.; WYNENDAELE, J.; CHALOIN, O.; HOEBEKE, J.; MARINE, J. C.; DI FIORE, P. P.; TELERMAN, A. Reciprocal repression between P53 and TCTP. **Nature Medicine**, v. 18, p. 91-99, 2012.

AMSON, R.; PECE, S.; LESPAGNOL, A.; LESPAGNOL, A.; VYAS, R.; MAZZAROL, G.; TOSONI, D.; COLALUCA, I.; VIALE, G.; RODRIGUES-FERREIRA, S.; WYNENDAELE, J.; CHALOIN, O.; HOEBEKE, J.; MARINE, J.C.; DI FIORE, P.P.; TELERMAN, A. Reciprocal repression between P53 and TCTP. **Nature Medicine**, v. 18(1), p. 91-99, 2011.

AMZALLAG, N.; PASSER, B. J.; ALLANIC, D.; SEGURA, E.; THERY, C.; GOUD, B.; AMSON, R.; TELERMAN, A. TSAP6 facilitates the secretion of translationally controlled tumor protein/histamine-releasing factor via a nonclassical pathway. **Journal of biological chemistry**, v. 279, p. 46104-46112, 2004.

BAZILE, F.; PASCAL, A.; ARNAL, I.; LE CLAINCHE, C.; CHESNEL, F.; KUBIAK, J.Z. Complex relationship between TCTP, microtubules and actin microfilaments regulates cell shape in normal and cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 40, p. 555-565, 2009.

BERX, G.; AND VAN ROY, F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb. Perspective Biology* v. 1, 2009.

BHISUTTHIBHAN, J.; MESHNICK, S. R. Immunoprecipitation of [(3)H]dihydroartemisinin translationally controlled tumor protein (TCTP) adducts from Plasmodium falciparum-infected erythrocytes by using anti-TCTP antibodies. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, p. 2397-2399, 2001.

BOMMER, U.A. Cellular Function and Regulation of the Translationally Controlled Tumour Protein TCTP. **The Open Allergy Journal**, v. 5, p. 19-32, 2012.

BOMMER, U.A.; HENG, C.; PERRIN, A.; DASH, P.; LOBOV, S.; ELIA, A.; CLEMENS, M.J. Roles of the translationally controlled tumour protein (TCTP) and the double-stranded RNA dependent protein kinase, PKR, in cellular stress responses. **Oncogene**, v. 29(5), p. 763-773, 2010.

BOMMER, U. A.; THIELE, B. J. The translationally controlled tumour protein (TCTP). **The**

BOMMER, U. A.; BOROVJAGIN, A. V.; GREAGG, M. A.; JEFFREY, I. W.; RUSSELL, P.; LAING, K. G.; LEE, M.; CLEMENS, M. J. The RNAm of the translationally controlled tumor protein P23/TCTP is a highly structured RNA, which activates the dsRNA-dependent protein kinase PKR. **Rna**, v. 8, p. 478-496, 2002.

BRIOUDES, F.; THIERRY, A.M.; CHAMBRIER, P.; MOLLEREAU, B.; BENDAHMANE, M. Translationally controlled tumor protein is a conserved mitotic growth integrator in animals and plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 107(37), p. 16384-16389, 2010.

BURGESS, A.; LABBÉ, J.C.; VIGNERON, S.; BONNEAUD, N.; STRUB, J.M.; VAN DORSSELAER, A.; LORCA, T.; CASTRO, A. Chfr interacts and colocalizes with TCTP to mitotic spindle. **Oncogene**, v. 27, p. 5554-5566, 2008.

CAVALLARO, U.; CHRISTOFORI, G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. **Nature Review Cancer**, v. 4, p. 118–132, 2004.

CANS, C.; PASSER, B. J.; SHALAK, V.; NANCY-PORTEBOIS, V.; CRIBLE, V.; AMZALLAG, N.; ALLANIC, D.; TUFINO, R.; ARGENTINI, M.; MORAS, D.; FIUCCI, G.; GOUD, B.; MIRANDE, M.; AMSON, R.; TELERMAN, A. Translationally controlled tumor protein acts as a guanine nucleotide dissociation inhibitor on the translation elongation factor eEF1A. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 100, p. 13892-13897, 2003.

CARVALHO, M.A.; ZECCHIN, K.G.; SEGUIN, F.; BASTOS, D.C.; AGOSTINI, M.; RANGEL, A.L.; VEIGA, S.S.; RAPOSO, H.F.; OLIVEIRA, H.C.; LODA, M.; COLETTA, R.D.; GRANER, E. Fatty acid synthase inhibition with Orlistat promotes apoptosis and reduces cell growth and lymph node metastasis in a mouse melanoma model. **International Journal of Cancer**, v. 11, p. 2557-2565, 2008.

CHAN, T.H.; CHEN, L.; LIU, M.; HU, L.; ZHENG, B.J.; POON, V.K.; HUANG, P.; YUAN, Y.F.; HUANG, J.D.; YANG, J.; TSAO, G.S.; GUAN, X.Y. Translationally controlled tumor protein induces mitotic defects and chromosome missegregation in hepatocellular carcinoma development. **Hepatology**, v. 55(2), 491-505, 2012.

CHAN, T.H.; CHEN, L.; GUAN, X.Y. Role of translationally controlled tumor protein in cancer progression. **Biochemistry Research International**, 2012b.

CHEN, Y.; FUJITA, T.; ZHANG, D.; DOAN, H.; PINKAEW, D.; LIU, Z.; WU, J.; KOIDE, Y.; CHIU, A.; LIN, C.C.; CHANG, J.Y.; RUAN, K.H.; FUJISE, K. Physical and functional antagonism between tumor suppressor protein p53 and fortilin, an anti-apoptotic protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 32575-32585, 2011.

CHEN, X.; ROTENBERG, S. A. PhosphoMARCKS drives motility of mouse melanoma cells. **Cell Signalling**, v. 22, p. 1097-1103, 2010.

CHEN, S.H.; WU, P.P.S.; CHOU, C.H.; YAN, Y.T.; LIU, H.; WENG, S.Y.; YANG-YEN, H.F. A knockout mouse approach reveals that TCTP functions as an essential factor for cell proliferation and survival in a tissue- or cell type-specific manner. **Molecular biology of the cell**, v. 18, p. 2525-2532, 2007.

CHOMEZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **BioTechniques**, England, v.15, p.532-534, 1993.

CHU, Z.H.; LIU, L.; ZHENG, C.X.; LAI, W.; LI, S.F.; WU, H.; ZENG, Y.J.; ZHAO, H.Y.; GUAN, Y.F. Proteomic analysis identifies translationally controlled tumor protein as a mediator of phosphatase of regenerating liver-3-promoted proliferation, migration and invasion in human colon cancer cells. **Chinese Medical journal**, v. 156, p. 185-190, 2011.

CLEMENS, J.C.; WORBY, C.A.; SIMONSON-LEFF, N.; MUDA, M.; MAEHAMA, T.; HEMMINGS, B.A.; DIXON, J.E. Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. **Proceedings of National Academy Science of the U S A**, v. 97, p. 6499-64503, 2000.

CULP, W.D.; NEAL, R.; MASSEY, R.; EGEVARD, L.; PISA, P.; GARLAND, D. Proteomic Analysis of Tumor Establishment and Growth in the B16-F10 Mouse Melanoma Model. **Journal of Proteomic Research**, v. 5(6), p.1332-1343, 2006.

DAVIES, H.; BIGNELL, G.R.; COX, C.; STEPHENS, P.; EDKINS, S.; CLEGG, S.; TEAGUE, J.; WOFFENDIN, H.; GARNETT, M.J.; BOTTOMLEY, W.; DAVIS, N.; DICKS, E.; EWING, R.; FLOYD, Y.; GRAY, K.; HALL, S.; HAWES, R.; HUGHES, J.; KOSMIDOU, V.; MENZIES, A.; MOULD, C.; PARKER, A.; STEVENS, C.; WATT, S.; HOOPER, S.; WILSON, R.; JAYATILAKE, H.; GUSTERSON, B.A.; COOPER, C.; SHIPLEY, J.; HARGRAVE, D.; PRITCHARD-JONES, K.; MAITLAND, N.; CHENEVIX-TRENCH, G.; RIGGINS, G.J.; BIGNER, D.D.; PALMIERI, G.; COSSU, A.; FLANAGAN, A.; NICHOLSON, A.; HO, J.W.; LEUNG, S.Y.; YUEN, S.T.; WEBER, B.L.; SEIGLER, H.F.; DARROW, T.L.; PATERSON, H.; MARAIS, R.; MARSHALL, C.J.; WOOSTER, R.; STRATTON, M.R.; FUTREAL, P.A. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v. 417(6892), p.949-54, 2002.

DENG, S.S.; XING, T.Y.; ZHOU, H.Y.; XIONG, R.H.; LU, Y.G.; WEN, B.; LIU, S.Q.; YANG, H.J. Comparative proteome analysis of breast cancer and adjacent normal breast tissues in human. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, v. 4 p. 165-172, 2006.

DICK, O.W.; SANTOS, M.L.R. dos; SANTOS, F.A.R. dos; FRICHENBRUDER, J.A. Epidemiologia do Melanoma Maligno: revisão de 163 casos. **Acta Ontológica Brasileira**, v. 8(2), p.83-86, 1988.

DONG, X.; YANG, B.; LI, Y.; ZHONG, C.; DING, J. Molecular Basis of the Acceleration of the GDP-GTP Exchange of Human Ras Homolog Enriched in Brain by Human Translationally Controlled Tumor Protein. **Journal of biological chemistry**, v. 284, p. 23754, 2009.

DUNCAN, K.; HEALD, P. Cutaneous T-cell lymphoma: centuries of controversy. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 17, p.133-140, 1998.

EFFERTH, T. Antiplasmodial and antitumor activity of artemisinin--from bench to bedside. **Planta medica**, v. 73, p. 299, 2007.

ELBASHIR, S.M.; HARBORTH, J.; LENDECKEL, W.; YALCIN, A.; WEBER, K.; TUSCHL, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. **Nature**, v.411, p.494-498, 2001.

FANG, D.; NGUYEN, T.K.; LEISHEAR, K.; FINKO, R.; KULP, A.N.; HOTZ, S.; VAN BELLE, P.A.; XU, X.; ELDER, D.E.; HERLYN, M. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. **Cancer Research**, v.65, p. 9328-9337, 2005.

FIDLER IJ. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival *in vivo*. **Cancer Research**, v.35, p. 218-224, 1975.

FIDLER, I.J. Selection of successive tumor lines for metastasis. **Nature**, v.241, p.148-148, 1973.

FIDLER, I.J. The pathogenesis of cancer metastasis: the “see and soil” hypothesis revisited. **Nature Review Cancer**, v.3, p- 453-458, 2003.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M.K.; KOSTAS, S.A.; DRIVER, S.E.; MELLO, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, p. 806-811, 1998.

GACHET, Y.; TOURNIER, S.; LEE, M.; LAZARIS-KARATZAS, A.; POULTON, T.; BOMMER, U. A. The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. **Journal of cell science**, v. 112 (Pt 8), p. 1257-1271, 1999.

GARNIS, C.; BUYS, T. P. H.; LAM, W.T. Genetic alteration and gene expression modulation during cancer progression. **Molecular Cancer**, p. 3-9, 2004.

GE, F.; ZHANG, L.; TAO, S.C.; KITAZATO, K.; ZHANG, Z.P.; ZHANG, X.E.; BI, L.J. Quantitative proteomic analysis of tumor reversion in multiple myeloma cells. **Journal of Proteome Research**, v. 10(2), p. 845-855, 2011.

GNANASEKAR, M.; THIRUGNANAM, S.; ZHENG, G.; CHEN, A.; RAMASWAMY, K. Gene silencing of translationally controlled tumor protein (TCTP) by siRNA inhibits cell growth and induces apoptosis of human prostate cancer cells. **International journal of oncology**, v. 34, p. 1241-1246, 2009.

GOTTUMUKKALA, S.N.; DWARAKANATH, C.D.; SUDARSAN, S. Ribonucleic acid interference induced gene knockdown. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v.17, p. 417-422, 2013.

GRAIDIST, P.; YAZAWA, M.; TONGANUNT, M. Fortilin binds Ca^{2+} and blocks Ca^{2+} -dependent apoptosis *in vivo*. **Biochemistry Journal**, v. 408, p. 181-191, 2007.

GRAIDIST, P.; PHONGDARA, A.; FUJISE, K. Antiapoptotic protein partners fortilin and MCL1 independently protect cells from 5-fluorouracil-induced cytotoxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279(39), p. 40868-40875, 2004.

GRAY-SCHOPFER, V.C.; CHEONG, S.C.; CHONG, H.; CHOW, J.; MOSS, T.; ABDEL-MALEK, Z.A.; MARAIS, R.; WYNFORD-THOMAS, D.; BENNETT, D.C. Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16? **British Journal of Cancer**, v. 21;95(4), p. 496-505, 2006.

GREEN, A. Sun exposure and risk of melanoma. **Australian Journal of Dermatology**, v.25, p.99-102, 1984.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Halmarks of Cancer: The Next Generetion. **Cell**, v.144, p.646- 674, 2011.

HARLOW, E.; LANE, D. Antibodies: a laboratory manual. CSHL Press. 1. ed. New York, 1988.

HINOJOSA-MOYA, J.; XOCONOSTLE-CAZARES, B.; PIEDRA-IBARRA, E.; MENDEZ-TENORIO, A.; LUCAS, W. J.; RUIZ-MEDRANO, R. Phylogenetic and structural analysis of translationally controlled tumor proteins. **Journal of molecular evolution**, v. 66, p. 472-483, 2008.

HOCKER, T.; TSAO, H. Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants. **Human Mutation**, v.28, p. 578-588, 2007.

HSU, Y. C.; CHERN, J. J.; CAI, Y.; LIU, M.; CHOI, K. W. Drosophila TCTP is essential for growth and proliferation through regulation of dRheb GTPase. **Nature**, v. 445, p. 785-788, 2007.

HUSSEIN, M.R.; HAEMEL, A.K.; WOOD, G.S.
Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms. **The Journal of Pathology**, v. 199(3), p.275-288, 2003.

Instituto Nacional do Câncer – INCA. Estimativa 2012- Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>> Acesso em: 05 de abril de 2012.

ISHIGURO, T.; NAKAJIMA, M.; NAITO, M.; MUTO, T.; TSURUO, T. Identification of Genes Differentially Expressed in B16 Murine Melanoma Sublines with Different Metastatic Potentials. **Cancer Research**, v.56, p. 875-879, 1996.

JANKUN, J.; ALEEM, A.M.; SPECHT, Z.; KECK, R.W.; LYSIAK- SZYDLOWSKA, W.; SELMAN, S.H.; SKRZYPCZAK-JANKUN, E. PAI-1 induces cell detachment, downregulates nucleophosmin (B23) and fortilin (TCTP) in LnCAP prostate cancer cells. **International Journal of Molecular Medicine** v. 20, p. 11-20, 2007.

JOHANSSON, H.; SVENSSON, F.; RUNNBERG, R.; SIMONSSON, T.; SIMONSSON, S. Phosphorylated nucleolin interacts with translationally controlled tumor protein during mitosis and with Oct4 during interphase in ES cells. **PLoS One**, v. 5(10) p. e13678, 2010¹.

JOHANSSON, H.; VIZLIN-HODZIC, D.; SIMONSSON, T.; SIMONSSON, S. Translationally controlled tumor protein interacts with nucleophosmin during mitosis in ES cells. **Cell Cycle**, v. 9(11), p. 2160-2169, 2010².

JUNG, J.; KIM, M.; KIM, M. J.; KIM, J.; MOON, J.; LIM, J. S.; KIM, M.; LEE, K. Translationally controlled tumor protein interacts with the third cytoplasmic domain of Na,K-ATPase alpha subunit and inhibits the pump activity in HeLa cells. **Journal of biological chemistry**, v. 279, p. 49868-49875, 2004.

KADISON, A.S.; MORTON, D. L. Immunotherapy of malignant melanoma. **The Surgical Clinics of North America**, v. 83, p. 343-370, 2003.

KIM, J. E.; KOO, K. H.; KIM, Y. H.; SOHN, J.; PARK, Y. G. Identification of potential lung cancer biomarkers using an in vitro carcinogenesis model. **Experimental & molecular medicine**, v. 40, p. 709-720, 2008.

KIM, M.; JUNG, Y.; LEE, K.; KIM, C. Identification of the calcium binding sites in translationally controlled tumor protein. **Archives of pharmacal research**, v. 23, p. 633-636, 2000.

KUBIAK, J.Z.; BAZILE, F.; PASCAL, A. Temporal regulation of embryonic M-phases. **Folia Histochemistry Cytobiology**, v.46(1), p. 5-9, 2008.

KUNATH, T.; GISH, G.; LICKERT, H.; JONES, N.; PAWSON, T.; ROSSANT, J. Transgenic RNA interference in ES cell-derived embryos recapitulates a genetic null phenotype. **Nature Biotechnology**, v.21, p.559-561, 2003.

LANGDON, J.M.; VONAKIS, B.M.; MACDONALD, S.M. Identification of the interaction between the human recombinant histamine releasing factor/translationally controlled tumor protein and elongation factor-1 delta (also known as eElongation factor-1B beta). **Biochimistry Biophys Acta**, v. 1688(3), p. 232-6, 2004.

LEE, J.H.; RHO, S.B.; PARK, S.Y.; CHUN, T. Interaction between fortilin and transforming growth factor-beta stimulated clone-22 (TSC-22) prevents apoptosis via the destabilization of TSC-22. **FEBS Letters**, v. 582(8), p. 1210-1218, 2008.

LI, F.; ZHANG, D.; FUJISE, K. Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein. **Journal of biological chemistry**, v. 276, p. 47542-47549, 2001.

LILLEY, C.J.; DEVLIN, P.; URWIN, P.E.; ATKINSON, H.J. Parasitic nematodes, proteinases and transgenic plants. **Parasitology Today**, v.15, p. 414-417, 1999.

LIU, H.; PENG, H. W.; CHENG, Y. S.; YUAN, H. S.; YANG-YEN, H. F. Stabilization and enhancement of the antiapoptotic activity of mcl-1 by TCTP. **Molecular Cell Biology**, v. 25, p. 3117-3126, 2005.

LUCIBELLO, M.; GAMBACURTA, A.; ZONFRILLO, M.; PIERIMARCHI, P.; SERAFINO, A.; RASI, G.; RUBARTELLI, A.; GARACI, E. TCTP is a critical survival factor that protects cancer cells from oxidative stress induced cell death. **Experimental Cell Research**, v. 317(17), p. 2479-2489, 2011.

MA, Q.; GENG, Y.; XU, W.; WU, Y.; HE, F.; SHU, W.; HUANG, M.; DU, H.; LI, M. The role translationally controlled tumor protein in tumor growth and metastasis of colon adenocarcinoma cells. **Journal Proteome Research**, v. 9, p. 40-49, 2010.

MCCAFFREY, A.P.; MEUSE, L.; PHAM, T.T.; CONKLIN, D.S.; HANNON, G.J.; KAY, M.A. RNA interference in adult mice. **Nature**, v. 418, p. 38-39, 2002.

MCKENZIE, J.A.; GROSSMAN, D. Role of the apoptotic and mitotic regulator survivin in melanoma. **Anticancer Research**, v. 32, p. 397-404, 2012.

MILLER, A.J.; MIHM, M.C. JR. Melanoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 355(1), p. 51-65, 2006.

MOOI, W.J.; PEEPER, D.S. Oncogene-Induced Cell Senescence-Halting on the Road to Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v.355, p. 1037-1046, 2006.

MOUSSES, S.; CAPLEN, N.J.; CORNELISON, R.; WEAVER, D.; BASIK, M.; HAUTANIEMI, S.; ELKAHLOUN, A.G.; LOTUFO, R.A.; CHOUDARY, A.; DOUGHERTY, E.R.; SUH, E.; KALLIONIEMI, O. RNAi microarray analysis in cultured mammalian cells. **Genome Research**, v. 13, p. 2341-2347, 2003.

MUTHUSAMY, V.; DURAISAMY, S.; BRADBURY, C. M.; HOBBS, C.; CURLEY, D. P.; NELSON, B.; BOSENBERG, M. Epigenetic silencing of novel tumor suppressors in malignant melanoma. **Cancer Research**, v.66, p. 11187-11193, 2006.

NAKAMURA, K.; YOSHIKAWA, N.; YAMAGUCHI, Y.; KAGOTA, S.; SHINOZUKA, K.; KUNITOMO, M. Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. **Life Science**, v.70, p.791-798, 2002.

NICOLSON, G.L.; BRUNSON, K.W.; FIDLER, I.J. Specificity of arrest, survival, and growth of selected metastatic variant cell lines. **Cancer Research**, v.38, p.4105-4111, 1978.

NIFOROU, K. M.; ANAGNOSTOPOULOS, A. K.; VOUGAS, K.; KITTAS, C.; GORGOULIS, V. G.; TSANGARIS, G. T. The proteome profile of the human osteosarcoma U2OS cell line. **Cancer genomics & proteomics**, v. 5, p. 63-78, 2008.

PAN, Y.; SONG, Q.L.; LIN, Y.H.; LU, N.; YU, H.M.; LI, X.J. GLB prevents tumor metastasis of Lewis lung carcinoma by inhibiting tumor adhesion actions. **Acta Pharmacology**, v.26, p.881-886, 2005.

PEKARIK, V.; BOURIKAS, D.; MIGLINO, N.; JOSET, P.; PREISWERK, S.; STOECKLI, E.T. Screening for gene function in chicken embryo using RNAi and electroporation. **Nature Biotechnology**, v.21, p. 93-96, 2003.

PERLIS, C.; HERLYN, M. Recent advances in melanoma biology. **The Oncologist**, v.9(2), p.182-187, 2004.

REHMANN, H.; BRUNING, M.; BERGHAUS, C.; SCHWARTEN, M.; KOHLER, K.; STOCKER, H.; STOLL, R.; ZWARTKRUIS, F. J.; WITTINGHOFER, A. Biochemical characterisation of TCTP questions its function as a guanine nucleotide exchange factor for Rheb. **FEBS Letters**, v. 582, p. 3005-3010, 2008.

REYA, T.; MORRISON, S.J.; CLARKE, M.F.; WEISSMAN, I.L. Stem cells, cancer, and cancer

stem cells. **Nature**, v.414, p. 105-111, 2001.

RINNERTHALER, M.; JAROLIM, S.; HEEREN, G.; PALLE, E.; PERJU, S.; KLINGER, H.; BOGENGRUBER, E.; MADEO, F.; BRAUN, R. J.; BREITENBACHKOLLER, L.; BREITENBACH, M.; LAUN, P. MMI1 (YKL056c, TMA19), the yeast orthologue of the translationally controlled tumor protein (TCTP) has apoptotic functions and interacts with both microtubules and mitochondria. **Biochimica et Biophysica acta**, v. 1757, p. 631-638, 2006.

RHO, S.B.; LEE, J.H.; PARK, M.S.; BYUN, H.J.; KANG, S. SEO, S.S.; KIM, J.Y.; PARK, S.Y. Anti-apoptotic protein TCTP controls the stability of the tumor suppressor p53. **FEBS Letters**, v. 585(1), p. 29-35, 2011.

RODRIGUEZ, L. G.; WU, X.; GUAN, J. L. Wound-healing assay. **Methods Mol Biol** [S.I.], v. 294, p. 23-9, 2005.

ROTHHAMMER, T.; BOSSERHOFF, A. K. Epigenetic events in malignant melanoma. **Pigment Cell Research**, v.20, p.92-111, 2007.

SADE, Y.B.; BOIA-FERREIRA, M.; GREMSKI, L.H.; DA SILVEIRA, R.B.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O.M.; VEIGA, S.S. Molecular cloning, heterologous Expression and functional characterization of a novel translationally-controlled tumor protein (TCTP) family member from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.44, p.170-177, 2012.

SAIDA, T. The recent advances in melanoma research. **Journal of Dermatological Science**, v.6, p. 1-13, 2001.

SALEEM, M.; MADDODI, N.; ABU ZAID, M.; KHAN, N.; BIN HAFEEZ, B.; ASIM, M.; SUH, Y.; YUN, J.M.; SETALURI, V.; MUKHTAR, H. Lupeol inhibits growth of highly aggressive human metastatic melanoma cells in vitro and *in vivo* by inducing apoptosis. **Clinical Cancer Research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v.14, p.2119-2127, 2008.

SAMBROOK, J. RUSSEL, D. W. Molecular Cloning. 3rd edition. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, v.3, 2001.

SINHA, P.; KOHL, S.; FISCHER, J.; HÜTTER, G.; KERN, M.; KÖTTGEN, E.; DIETEL, M.; LAGE, H.; SCHNÖLZER, M.; SCHADENDORF, D. Identification of novel proteins associated with the development of chemoresistance in malignant melanoma using two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v.21, p. 3048-3057, 2000.

SIROIS, I.; RAYMOND, M.A.; BRASSARD, N.; CAILHIER, J.F.; FEDJAEV, M.; HAMELIN, K.; LONDONO, I.; BENDAYAN, M.; PSHEZHETSKY, A.V.; HÉBERT, M.J. Caspase-3-dependent export of TCTP: a novel pathway for antiapoptotic intercellular communication. **Cell death and differential**, v. 18(3), p. 549-562, 2011.

SLABY, O.; SOBKOVA, K.; SVOBODA, M.; GARAJOVA, I.; FABIAN, P.; HRSTKA, R.; NENUTIL, R.; SACHLOVA, M.; KOKAKOVA, I.; MICHALEK, J.; SMERDOVA, T.; KNOFLICKOVA, D.; VYZULA, R. Significant overexpression of Hsp110 gene during colorectal cancer progression. **Oncology reports**, v. 21, p. 1235-1241, 2009.

SOTILLO, R.; GARCÍA, J.F.; ORTEGA, S.; MARTIN, J.; DUBUS, P.; BARBACID, M.; MALUMBRES, M. Invasive melanoma in Cdk4-targeted mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, v.98(23), p.13312-13317, 2001.

SUSAN, E. Z.; HERLYN, M. Learning the ABC's of Melanoma- Initiating Cells. *Cancer Cell*, v.13, 2008.

SUSINI, L.; BESSE, S.; DUFLAUT, D.; LESPAGNOL, A.; BEEKMAN, C.; FIUCCI, G.; ATKINSON, A.R.; BUSO, D.; POUSSIN, P.; MARINE, J.C.; MARTINOU, J.C.; CAVARELLI, J.; MORAS, D.; AMSON, R.; TELERMAN, A. TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing bax function. *Cell death and differentiation*, v.15, p. 1211-1220, 2008.

TALMADGE, J.E.; FIDLER, I.J. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Research*, v. 70, p. 5649–5669, 2010.

TANIGUCHI, K.; KÄRRE, K.; KLEIN, G. Lung colonization and metastasis by disseminated B16 melanoma cells: H-2 associated control at the level of the host and the tumor cell. *International Journal of Cancer*, v.36, p.503-510, 1985.

TELERMAN, A.; AMSON, R. The molecular programme of tumour reversion: the steps beyond malignant transformation. *Nature reviews. Cancer*, v. 9, p. 206-216, 2009.

TENLLADO, F.; MARTÍNEZ-GARCÍA, B.; VARGAS, M.; DÍAZ-RUÍZ, J.R. Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. *BMC Biotechnology*, v.20, 2003.

THAW, P.; BAXTER, N. J.; HOUNSLOW, A. M.; PRICE, C.; WALTHO, J. P.; CRAVEN, C. J. Structure of TCTP reveals unexpected relationship with guanine nucleotide-free chaperones. *Nature structural biology*, v. 8, p. 701-704, 2001.

THIELE, H.; BERGER, M.; SKALWEIT, A.; THIELE, B. J. Expression of the gene and processed pseudogenes encoding the human and rabbit translationally controlled tumour protein (TCTP). *European journal of biochemistry*, v. 267, p. 5473-5481, 2000.

THIELE, H.; BERGER, M.; LENZNER, C.; KUHN, H.; THIELE, B. J. Structure of the promoter and complete sequence of the gene coding for the rabbit translationally controlled tumor protein (TCTP) P23. *European journal of biochemistry*, v. 257, p. 62-68, 1998.

TSAROVA, K.; YARMOLA, E.G.; BUBB, M.R. Identification of a cofilin-like actin-binding site on translationally controlled tumor protein (TCTP). *FEBS Letters*, v. 584(23), p. 4756-4760, 2011.

TUCKER, M.A.; GOLDSTEIN, A.M. Melanoma etiology: where are we? *Oncogene*, v. 22, p. 3042–3052, 2003.

TUYNDER, M.; FIUCCI, G.; PRIEUR, S.; LESPAGNOL, A.; GÉANT, A.; BEAUCOURT, S.; DUFLAUT, D.; BESSE, S.; SUSINI, L.; CAVARELLI, J.; MORAS, D.; AMSON, R.; TELERMAN, A. Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, v. 101, p. 15364-15369, 2004.

TUYNDER, M.; SUSINI, L.; PRIEUR, S.; BESSE, S.; FIUCCI, G.; AMASON, R.; TELERMAN, A. Biological models and genes of tumor reversion: cellular reprogramming through *tpt1*/TCTP and SIAH-1. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.**, v. 99, p. 14976-14981, 2002.

VALLES, S.L.; BENLLOCH, M.; RODRIGUEZ, M.L.; MENA, S.; PELLICER, J.A.; ASENS, I. M.; OBRADOR, E.; ESTRELA, J.M. Stress hormones promote growth of B16-10 melanoma metastases: an interleukin 6- and glutathione-dependent mechanism. **Journal of Translational Medicine**, 2013.

VAN DE SANDE, W.W.; JANSE, D.J.; HIRA, V.; GOEDHART, H.; VAN DER ZEE, R.; AHMED, A.O.; OTT, A.; VERBRUGH, H.; VAN BELKUM, A. Translationally controlled tumor protein from *Madurella mycetomatis*, a marker of tumorous mycetoma progression. **Journal Immunology**, v. 177, p. 1997-2005, 2006.

VAN KEMPEN, L. C.; RUITER, D. J.; VAN MUIJEN, G. N.; COUSSENS, L. M. The tumor microenvironment: a critical determinant of neoplastic evolution. **European Journal of Cell Biology**, v. 82, p. 539-548, 2003.

VENUGOPAL, T. Evolution and expression of translationally controlled tumour protein (TCTP) of fish. Comparative biochemistry and physiology. **Part B, biochemistry & molecular biology**, v. 142, p. 8-17, 2005.

WANG, X.; FONSECA, B. D.; TANG, H.; LIU, R.; ELIA, A.; CLEMENS, M. J.; BOMMER, U. A.; PROUD, C. G. Re-evaluating the roles of proposed modulators of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling. **Journal of biological chemistry**, v. 283, p. 30482-30492, 2008.

WICHA, M. S.; LIU, S.; DONTU, G. Cancer stem cells: an old idea-a paradigm shift. **Cancer Research**, v. 66, p. 1883-1890, 2006.

WU, D.; GUO, Z.; MIN, W.; ZHOU, B.; LI, M.; LI, W.; LUO, D. Upregulation of TCTP expression in human skin squamous cell carcinoma increases tumor cell viability through anti-apoptotic action of the protein. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 3, p. 437-442, 2011.

XIANG, S.; FRUEHAUF, J.; LI, C.J. Short hairpin RNA-expressing bacteria elicit RNA interference in mammals. **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 697-702, 2006.

XU, A.; BELLAMY, A. R.; TAYLOR, J. A. Expression of translationally controlled tumour protein is regulated by calcium at both the transcriptional and posttranscriptional level. **The biochemical journal**, v. 342 Pt 3, p. 683-689, 1999.

YANG, Y.; YANG, F.; XIONG, Z.; YAN, Y.; WANG, W.; NISHINO, M.; NQUVEN, J.; WANG, H.; YANG, X.F. An N-terminal region of translationally controlled tumor protein is required for its antiapoptotic activity. **Oncogene**, v. 24, p. 4778-4788, 2005.

YAO, Y.; JIA, X. Y.; TIAN, H. Y.; JIANG, Y. X.; XU, G. J.; QIAN, Q. J.; ZHAO, F. K. Comparative proteomic analysis of colon cancer cells in response to Oxaliplatin treatment. **Biochimica and**

biophysica acta, 2009.

YARM, F. R. Plk phosphorylation regulates the microtubule-stabilizing protein TCTP. **Molecular and cellular biology**, v.22, p. 6209-6221,2002.

ZAID, M.R.; DAY, C.P.; MERLINO, G. From UVs to metastasis: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128(10), p. 2381-2391, 2008.

ZEMSKOV, E.A.; JANIAK, A.; HANG, J.; WAGHRAY, A.; BELKIN, A.M. The role of tissue transglutaminase in cell-matrix interactions **Frontiers in Bioscience**, v.11, p.1057-1076,2006.

ZHANG, D.; LI, F.; WEIDNER, D.; MNJOYAN, Z. H.; FUJISE, K. Physical and functional interaction between myeloid cell leukemia 1 protein (MCL1) and fortilin the potential role of mcl1 as a fortilin chaperone. **Journal of biological chemistry**, v. 277, p. 37430-37438, 2002.

ZHAO, Y.Y.; SATO, Y.; ISAJI, T.; FUKUDA, T.; MATSUMOTO, A.; MIYOSHI, E. Branched N-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins. **Jornal FEBS**, v. 275, p. 1939-1948, 2008.

ZHENG, H.Q.; LIU, D.Y. Anti-invasive and anti-metastatic effect of ampelopsin on melanoma. **Ai Zheng**, v. 22, p.363-367, 2003.

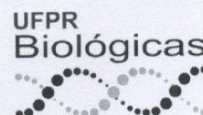
ZHU, W. L.; CHENG, H. X.; HAN, N.; LIU, D. L.; ZHU, W. X.; FAN, B. L.; DUAN, F. L. Messenger RNA expression of translationally controlled tumor protein (TCTP) in liver regeneration and cancer. **Anticancer research**, v. 28, p. 1575-1580, 2008.

ANEXOS

Anexo I- Créditos Obtidos Durante o Mestrado



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular, Molecular e Fisiologia
Direção do Setor de Ciências Biológicas



HISTÓRICO ESCOLAR - MESTRADO



Pós-Graduando	MARIANA BOIA FERREIRA					
Programa	Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular					
Instituição:	Universidade Federal do Paraná					
Área de Concentração	Biologia Celular e Molecular					
Nível	Mestrado					
Data de Matrícula no Curso	Março 2012					
Orientador	Profa. Dra. ANDREA SENFF RIBEIRO					
Conceito do Curso: 5 (Portaria do MEC 524. DOU 30/04/2008 – Parecer CES/CNE 33/2008 – 29/04/2008).						
Curso reconhecido pela Portaria nº 8531/01-72, da Resolução Nº: 89/01 A-CEPE - Currículo disciplinas: 2009.						
Código / Disciplinas	Cursadas	Mestrado/Doutorado	Ano	C. H.	N. Cred	Conc.
BC-756	Biologia Celular		2012	120	08	B
BCM709	Técnicas Básicas em Microscopia		2012	90	06	A
BCM701	Seminários		2012	30	02	B
BCM702	Seminários Avançados em Biologia Molecular		2012	45	03	B
BCM708	Matriz Extracelular		2013	45	03	A
BCM 725	Ensino em Biologia Celular		2013	60	04	A
Total Créditos / Carga Horaria Cursados(a):						26
(A=9,0 a 10,0) (B=8,0 a 8,9) (C=7,0 a 7,9) (D=Zero a 6,9)						
Serão considerados aprovados em disciplinas, os candidatos que lograrem os conceitos A, B, ou C . Obter no mínimo 18 créditos em disciplinas .						
Exame de Suficiência na língua inglesa:						
Data da Defesa da Dissertação:						
Título da Dissertação: ""						
Resultado Final:						
Composição da Banca Examinadora						
Nome:		Instituição:				
Dr. Andrea Senff Ribeiro (UFPR)						

Anexo II- Artigos Publicados Durante o Mestrado

2013



Modulation of membrane phospholipids, the cytosolic calcium influx and cell proliferation following treatment of B16-F10 cells with recombinant phospholipase-D from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom

Ana Carolina Martins Wille^{a, b}, Daniele Chaves-Moreira^a, Dilza Trevisan-Silva^a, Mariana Gabriel Magnoni^a, Marianna Boia-Ferreira^a, Luiza Helena Gremski^a, Waldemiro Gremski^{a, c}, Olga Meiri Chaim^a, Andrea Senff-Ribeiro^a, Silvio Sanches Veiga^a  

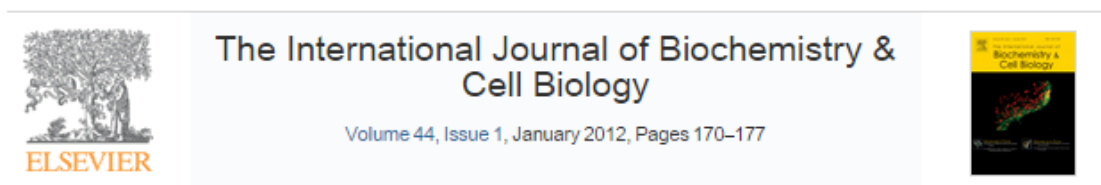
Under an Elsevier user license

 [Show more](#)



doi:10.1016/j.toxicon.2013.01.027

[Get rights and content](#)

2012



Molecular cloning, heterologous expression and functional characterization of a novel translationally-controlled tumor protein (TCTP) family member from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom ☆

Youssef B. Sade^{a, b}, Marianna Bóia-Ferreira^a, Luiza H. Gremski^a, Rafael B. da Silveira^{a, c}, Waldemiro Gremski^{a, d}, Andrea Senff-Ribeiro^a, Olga M. Chaim^a, Silvio S. Veiga^a  

Under an Elsevier user license

 [Show more](#)

doi:10.1016/j.biocel.2011.10.013

[Get rights and content](#)

Anexo III- Participação em Congressos



PARTICIPATION CERTIFICATE

We hereby certify that

MARIANNA BOIA FERREIRA

attended the XLII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) in the Convention Center of Hotel Rafain, Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil, on May 18 to 21, 2013.

MOACIR WAJNER
President of SBBq




PARTICIPATION CERTIFICATE

We hereby certify that

MARIANNA BOIA FERREIRA

attended the XLI Annual Meeting of The Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) in the Convention Center of Hotel Rafain, Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil, on May 19th to 22th, 2012.


Helena C. F Oliveira
President of SBBq



We certify that

MARIANNA BOIA FERREIRA

attended the 10th International Congress on Cell Biology and the XVI Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology held at Riocentro Exhibition and Convention Center, Rio de Janeiro, Brazil, July 25th to 28th, 2012.

Hernandes F. Carvalho



International Federation for Cell Biology IFCB



Patrícia Gama

SBBC Brazilian Society for Cell Biology

Organizing Committee

Anne Eichmann | Bechara Kachar | Estela Bevilacqua | Flávia Gomes | Irene Yan
James Armitage | Marimélia Porcionatto | Marilice F. Santos | Milton Moraes | Thereza Christina Barja-Fidalgo